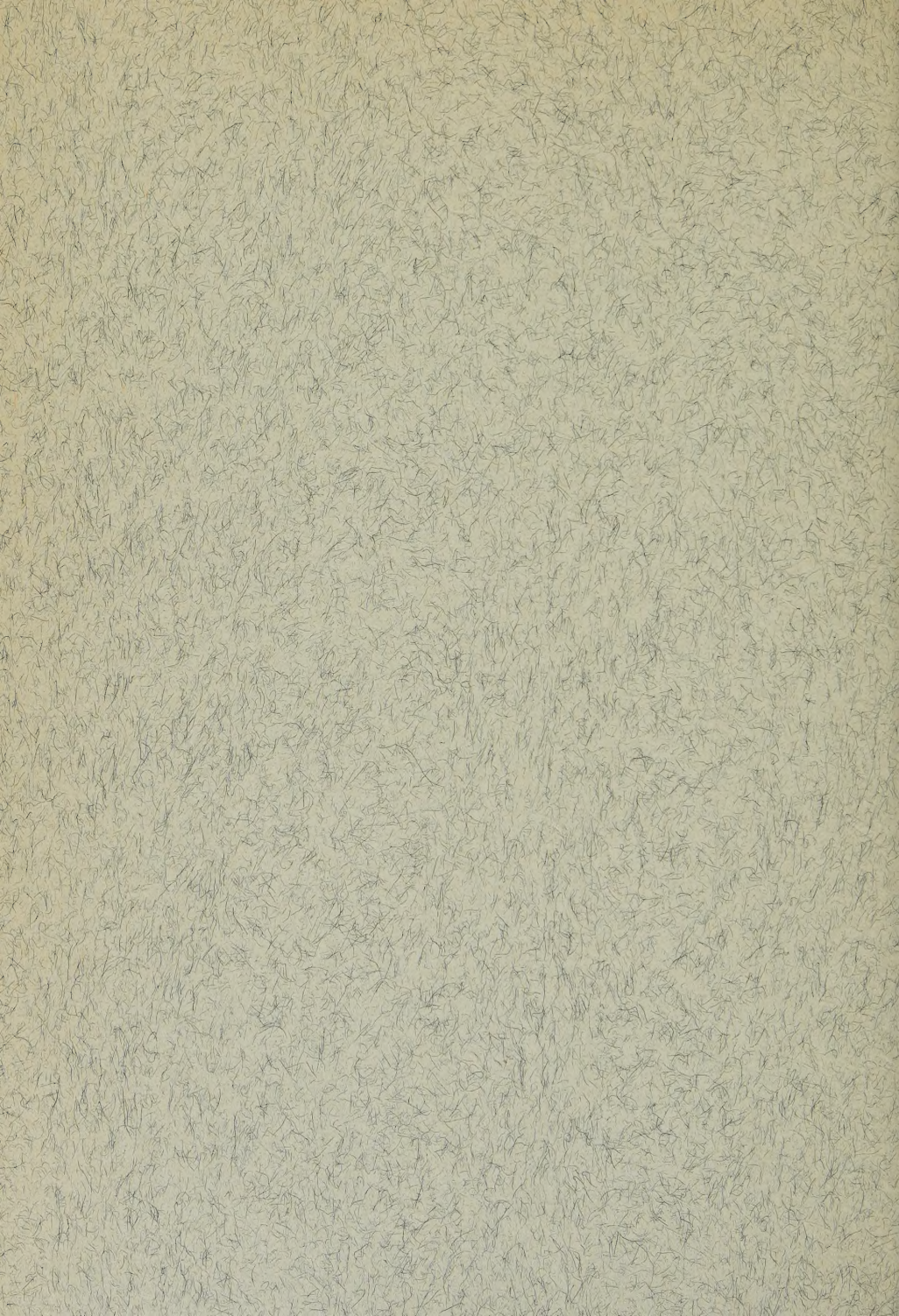


Paul Edmund Raabe

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE IN
FRUCTUS DAUCI CAROTAE VORKOMMENDEN
LUTEOLIN- UND APIGENINVERBINDUNGEN.

Frankfurt am Main 1965





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551901_0055



Untersuchungen über die in
Fructus Dauci carotae
vorkommenden Luteolin-und Apigeninverbindungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Paul Edmund Raabe
aus
Frankfurt am Main

1965

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dekan: Prof.Dr.phil. Herbert Lehmann

1. Referent: Prof.Dr.rer.nat. Heinz Janecke

2. Referent: Prof.Dr.phil. Carl Rohmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.Juli 1965

Tag der Promotion: 23.Juli 1965

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	6
1.2 Bedeutung der Flavone für die Pharmazie	6
1.2 Aufgabenstellung	7
2. <u>Allgemeiner Teil</u>	10
2.1 Flavonoide	10
2.1.1 Flavone	12
2.1.2 Flavanone	19
2.1.3 Anthocyanidine	22
2.1.4 Leukoanthocyanidine und Catechine	25
3. <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	30
3.1 Extraktion der Flavonverbindungen aus den Früchten von <i>Daucus carota</i>	30
3.2 Anreicherung der Flavonverbindungen durch fraktionierte Ausschüttelung	31
3.3 Säulenchromatographie	35
3.4 Identifizierung der Flavonverbindungen	38
3.4.1 Flavonverbindung F ₂	39
3.4.2 Flavonverbindung F ₃	63
3.4.3 Flavonverbindung F ₄	77
3.4.4 Flavonverbindung F ₁	90
3.5 Diskussion	95
4. <u>Experimenteller Teil</u>	98
4.1 Isolierung der Flavonverbindungen	98
4.2 Tauböck-Test	101
4.3 Zirkon-Zitronensäure-Test	102
4.4 Eisen-III-chlorid-Reaktion	102
4.5 Reduktionstest	102
4.6 Hydrolyse	104

4.7	Untersuchung des Hydrolysates	105
4.8	PC der Flavonverbindungen	110
4.9	Reaktion mit stabilen Diazoniumsalzen	111
4.10	Methylierung der Flavonglykoside	112
4.11	Methylierung der Zucker	113
4.12	UV-Absorptionsspektren	115
4.13	IR-Absorptionsspektren	116
5.	<u>Zusammenfassung</u>	117
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	118

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	6
1.1	Bedeutung der Flavone für die Pharmazie	6
1.2	Aufgabenstellung	7

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Flavone für die Pharmazie.

Unter Flavonen wird eine Gruppe von Pflanzenpigmenten verstanden, die im wesentlichen die gelbe oder gelblich weiße Färbung der Blütenblätter bedingen. Chemisch werden diese Verbindungen mit den Flavanonen, Anthocyanidinen, Leukoanthocyanidinen, Catechinen, Chalkonen und Auronen unter dem Begriff der Flavonoide zusammengefaßt.

Seit den Untersuchungen von S z e n t - G y ö r g y i und Mitarbeitern (1) über einen Synergismus zwischen Ascorbinsäure und Flavonoiden, wurde diese Gruppe der Pflanzenfarbstoffe einer systematischen physiologischen und pharmakologischen Überprüfung unterzogen. Es stellte sich heraus, daß das physiologische und pharmakologische Verhalten dieser Verbindungsklasse komplexer Natur ist; daher gewannen die Flavonoide zunehmend an medizinischem und pharmazeutischem Interesse.

Als isolierte Substanzen finden sie nur selten Verwendung in der Therapie; die pharmakologische Wirkung einer Reihe von Pflanzenauszügen ist jedoch den Flavonoiden zuzuordnen.

Im Vordergrund der komplexen Eigenschaften stehen Beeinflussung der Kapillarpermeabilität (1,2,3)

und des Kreislaufes (4,5,6,7), ferner choleretische (8), diuretische (9,10,11) und spasmolytische Effekte (12,13).

Vor einigen Jahren wurde von einem russischen Präparat berichtet, das einen alkoholischen Drogenauszug der Früchte von *Daucus carota* darstellt (14) und das als stark wirkendes Spasmolytikum bei Stenocardie Verwendung findet. H ö r h a m m e r und W a g n e r (15) berichteten in einer Arbeit über die Verteilung der Flavone in der Familie der Umbelliferen auch von dem Vorkommen dieser Pigmente in *Daucus carota*. Pe konnten sie in einem Methanol-extrakt der Blüten nach Hydrolyse die Aglukone Quercetin und Kämpferol nachweisen. Somit lag der Gedanke nahe, daß auch in den Früchten Flavone aufzufinden seien, und die spasmolytische Wirkung alkoholischer Auszüge auf diese Naturstoffe zurückzuführen sei.

1.2

Aufgabenstellung

Die Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, einige der Flavonverbindungen, und hier insbesondere die Luteolin- und Apigenin-Derivate, der Früchte von *Daucus carota* durch geeignete Extraktionsverfahren

zu konzentrieren, die angereicherten Flavone mittels präparativer Chromatographie in die einzelnen Verbindungen zu trennen und diese zu identifizieren.

2.	<u>Allgemeiner Teil</u>	10
2.1	Flavonoide	10
2.1.1	Flavone	12
2.1.2	Flavanone	19
2.1.3	Anthocyanidine	22
2.1.4	Leukoanthocyanidine und Catechine	25
2.1.4.1	Leukoanthocyanidine	26
2.1.4.2	Catechine	26

2. Allgemeiner Teil

2.1 Flavonoide

In einer kurzen Zusammenstellung soll ein Überblick über die Flavone und die ihnen strukturell verwandten Verbindungen gegeben werden. Es wird jedoch hervorgehoben, daß diese Übersicht nicht vollständig ist und nur dem Zwecke dienen soll, durch Aufzeichnen der strukturellen Unterschiede die Flavone näher zu kennzeichnen.

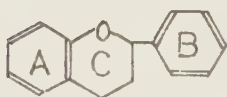
Unter den Flavonoiden wird eine Reihe von Pflanzepigmenten verstanden, die im Gegensatz zu den Carotinoiden vornehmlich hydrophile Eigenschaften besitzen und deren Bezeichnung von den ubiquitär vorkommenden Flavonen abgeleitet ist.

Zu ihnen werden gezählt:

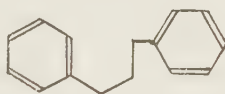
Flavone, Flavonole, Isoflavone, Flavanone, Dihydroflavonole (Flavanonole), Isoflavanone, Anthocyanidine, Leukoanthocyanidine, Catechine, Chalkone, Aurone.

Die Verbindungen sind aus $C_6 - C_3 - C_6$ Einheiten

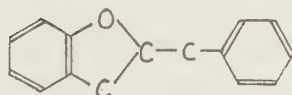
aufgebaut, d.h. zwei Benzolkerne sind über eine Propanbrücke miteinander verbunden. Je nach Art der Verknüpfung der beiden Benzolkerne mit der Propaneinheit werden drei Grundtypen unterschieden:



(I)



(II)



(III)

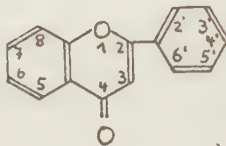
Typ I	Flavone, Flavonole, Isoflavone Flavanone, Dihydroflavonole, Iso- flavanone, Anthocyanidine, Leuko- anthocyanidine, Catechine.
Typ II	Chalkone
Typ III	Aurone

Im weiteren Verlauf dieser Zusammenstellung sollen nur die Pflanzenpigmente näher betrachtet werden, die dem Typ I angehören, da diese unmittelbar strukturell mit den Flavonen verwandt sind. Sie unterscheiden sich in der Oxydationsstufe im hetero-

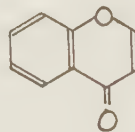
cyclischen Ring C und sollen zweckmäßigerweise danach eingeteilt werden.

2.1.1 Flavone

Die Flavone stellen Flavonoide mit dem höchsten Oxydationsgrad im Ring C dar. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, K u h n und L ö w (16) konnten Flavone in der Grünalge Chlamydomonas und K i s h i m o - t o (17) solche in verschiedenen Farnen nachweisen, sind sie Inhaltsstoffe höherer Pflanzen. Hier bleibt ihr Vorkommen nicht auf die Blüten beschränkt; auch in Blättern, Hölzern, Wurzeln und Samen sind diese gelb gefärbten Pigmente gefunden worden. Die chemische Struktur (IV) wurde im Jahre 1899 von K o s t a n e c k i (18) aufgeklärt. Er identifizier- te sie als am C2 phenylsubstituierte Derivate des Benzo- γ -pyrons (V).



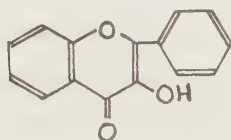
(IV)



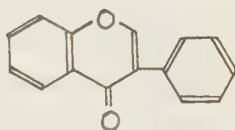
(V)

Das Benzo- γ -pyron, auch Chromon genannt, ist im Gegensatz zu den Flavonen ungefärbt. Erfolgte die Phenylsubstitution am C3 des Chromons, so wird von Isoflavonen gesprochen (VII).

Die 3-Hydroxyflavone werden häufig auch als Flavonole (VI) bezeichnet.



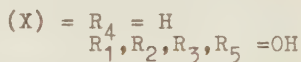
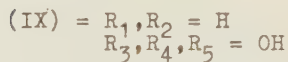
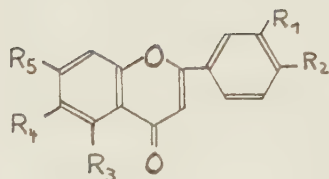
(VI)



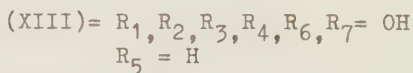
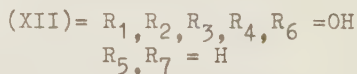
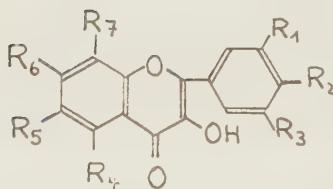
(VII)

Die Vielzahl der Flavone, Dea n (19) berichtet von ungefähr 70 bekannten Verbindungen, resultiert aus dem unterschiedlichen Hydroxylierungsgrad der von null OH-Gruppen (Flavon) bis maximal 7 OH-Gruppen (Hibiscetin) variieren kann. Dazu kommt, daß die OH-Gruppen teilweise veräthert oder glykosidiert sind.

Bei der Hydroxylierung läßt sich eine bestimmte Gesetzmäßigkeit feststellen. So liegen bei niedrigem Hydroxylierungsgrad vornehmlich C3 unsubstituierte Flavone (Apigenin: 5,7,4'-Trihydroxyflavon (VIII), Baicalin: 5,6,7-Trihydroxyflavon (IX), Luteolin: 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon (X)) vor,



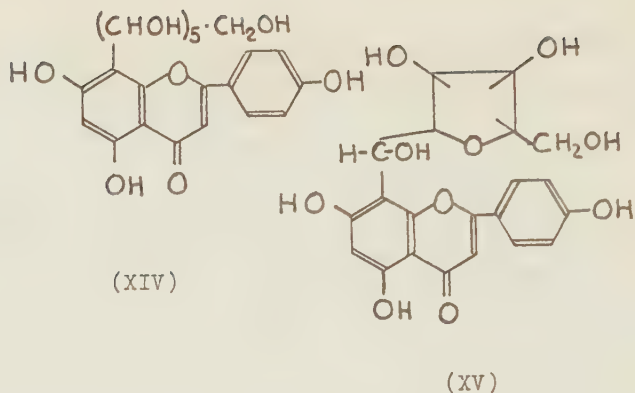
während mit zunehmender Hydroxylierung auch die Häufigkeit der C3-Substitution ansteigt. (Robinetin= 3,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavon (XI), Myricetin = 3,5,7,3',4',5'-Hexahydroxyflavon (XII), Hibiscetin= 3,5,7,8,3',4',5'-Heptahydroxyflavon (XIII)).



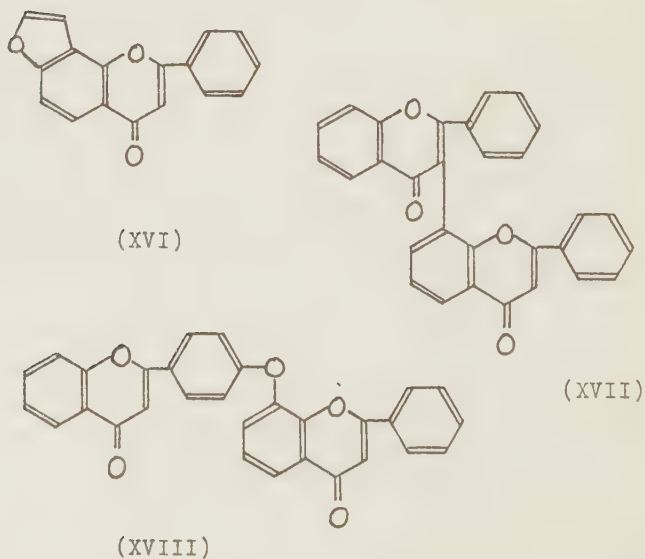
Aus (VIII)-(XIII) läßt sich unschwer erkennen, daß im Ring A OH-Gruppensubstitution bevorzugt am C5 und C7, im Ring B am C4' bzw. am C3' und C4' erfolgt.

Grundsätzlich können alle vorhandenen OH-Gruppen veräthert oder glykosidiert sein. Bei den Alkoxyderivaten überwiegen die Methyläther, vereinzelt wurden auch Methylenäther gefunden (20,21,22,23). Auch hier tritt analog der OH-Gruppen- Substitution eine Häufung der Ätherbildung am C5, C7, C3', C4' auf, während Glykosidbildungen meistens am C3 oder C7 zu verzeichnen sind. Verknüpfung der Aglukone mit den Zuckern am C4', C5 oder C6 ist selten, ebenso wie die Möglichkeit, daß zwei OH-Gruppen in einem Molekül glykosidiert sind. Die Glykoside stellen Monoside oder Bioside dar, deren Zuckeranteil bevorzugt aus Glukose, Galaktose, Rhamnose, Xylose und Apiose bestehen kann.

E v a n s (24) und H ö r h a m m e r (25) berichten von einem bislang unbekannten Flavontyp, den Flavonglykosylverbindungen, die lange Zeit als schwer hydrolysierbare Glykoside angesehen wurden. Diese Verbindungen tragen am C8 C - C gebunden einen Hexahydroxyhexylrest, der entweder kettenförmig (Saponaretin (XIV)) oder in Ringstruktur (Vitexin (XV)) angeordnet ist.

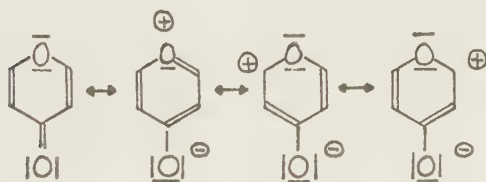


Unter der Vielzahl der natürlichen Flavonverbindungen konnten vereinzelt auch Furoflavone (XVI) und Biflavone aufgefunden werden. Letztere können sowohl C-C als auch C-O-C (XVII, XVIII) verknüpft sein.

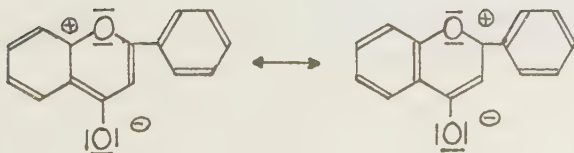
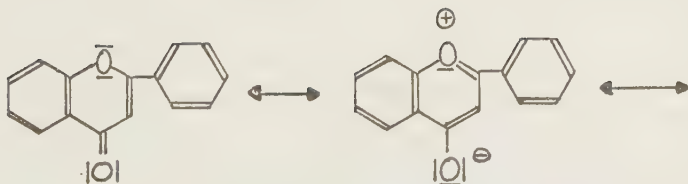
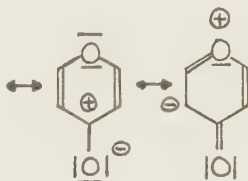


Das chemische Verhalten der Flavone wird weitgehend von dem heterocyclischen Ring C, der die Struktur des γ -Pyrons trägt, bestimmt.

So reagieren die Flavone analog den γ -Pyronen nicht mit Ketonreagenzien, was durch eine Mesomeriestabilisierung der γ -Pyrone (IXX) bzw. der Flavone (XX) zwischen verschiedenen Grenzstrukturen zu erklären ist.

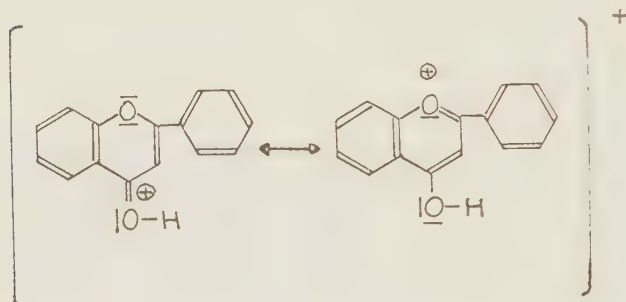


(IXX)



(XX)

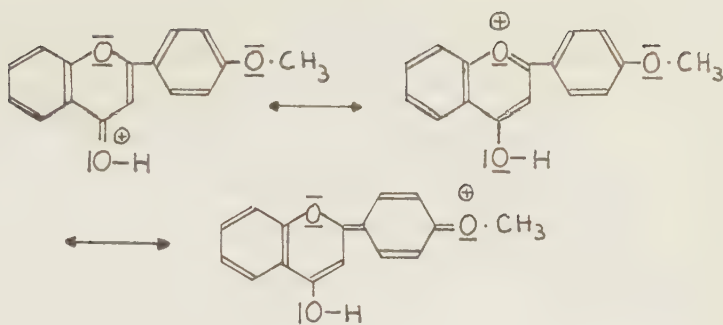
Auch die basischen Eigenschaften der Flavone stehen im Einklang mit der Struktur des γ -Pyrons. Sie stellen mäßig starke, sauerstoffhaltige Basen dar, deren pK_s -Werte zwischen -2,5 und 0,8 schwanken. Mit Säuren reagieren sie unter Salzbildung, wobei das Kation (XXI) durch Mesomerie stabilisiert ist.



(XXI)

Das Ausmaß der basischen Eigenschaften wird von den Substituenten weitgehend beeinflusst. Durch Einführen einer OH-Gruppe oder Methoxy-Gruppe am C4', C5 oder C7 kommt es zu einem Ansteigen der Basizität.

Geissman und Davis (26) erklären diese Erscheinungen damit, daß diese in Konjugation zur Carbonyl-Gruppe stehenden Substituenten sich mit einem freien Elektronenpaar an der Mesomerie des Gesamtsystems beteiligen, und somit das Kation durch Ausbildung neuer mesomerer Grenzstrukturen stabilisiert wird (XXII).



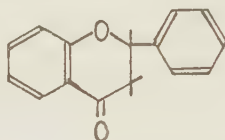
(XXII)

Diese Erklärung findet ihre Bestätigung darin, daß für das 4'-Methoxy-2',6'-dimethylflavon im Vergleich mit dem 4'-Methoxyflavon eine niedrigere Basizität gefunden wurde. Durch die beiden Methylgruppen am C2' und C6' wird der Arylrest aus seiner Koplanarität mit dem Benzo- γ -pyron-Ringsystem herausgedrängt. Die Möglichkeit der Teilnahme des Substituenten am C4' an der Mesomeriestabilisierung des Gesamtsystems ist somit nicht mehr gegeben.

2.1.2 Flavanone

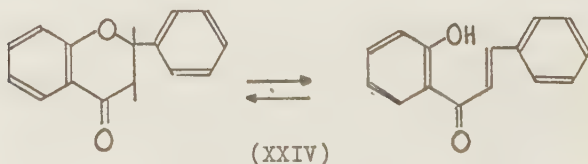
Als Verbindungen mit einer niedrigeren Oxydationsstufe im Ring C folgen auf die Flavone die Flavanone und ihre 3-OH-Derivate, die Flavanonole. Sie sind als 2,3-Dihydroflavone (XXIII) aufzufassen, und es ist

nicht selten, daß in einer Pflanze Flavone und ihre entsprechenden 2,3-Dihydro-Verbindungen nebeneinander vorliegen. Die Flavanone sind in der Natur nicht so verbreitet wie die Flavone. Ihr Vorkommen in der Pflanze bleibt hauptsächlich auf Hölzer, Rinden und Wurzeln beschränkt.



(XXIII)

Chemisch unterscheiden sich die Flavanone von den Flavonen dadurch, daß durch partielle Hydrierung des Ringes C die charakteristischen Eigenschaften des γ -Pyronringes verloren gehen. So ist die Stabilität des Dihydro- γ -pyronringes im Vergleich zu der des γ -Pyronringes der Flavone stark herabgesetzt. Unter der katalytischen Einwirkung von Basen wird der heterocyclische Ring der Flavanone zwischen dem Ringsauerstoff und dem Kohlenstoffatom C2 unter Bildung von Chalkonen (XXIV) geöffnet.



(XXIV)

Aus der partiellen Hydrierung resultiert ebenfalls, daß das Flavanonmolekül nicht mehr analog (XX) durch

Mesomerie stabilisiert ist. Die Carbonylgruppe zeigt somit typische Carbonylreaktionen, wie Oxim- und Hydrazonbildung (27).

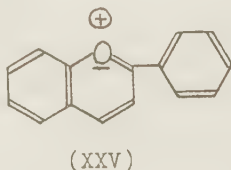
Als weiteres Merkmal tritt bei den Flavanonen und Flavanonolen optische Aktivität auf. So besitzen die Flavanone im C2 ein und die Flavanonole im C2 und C3 zwei optisch aktive Kohlenstoffatome. Aus pflanzlichem Material wurden bis jetzt hauptsächlich optisch inaktive Verbindungen isoliert. Es wird angenommen, daß die Flavanone und ihre 3-Hydroxyverbindungen in der Pflanze als optisch aktive Verbindungen vorliegen, jedoch bei der Isolierung durch die bestehende Isomerie zwischen Flavanonen und Chalkonen leicht razemisiert werden.

Die stereochemischen Verhältnisse bei den Flavanonolen wurden von Mahesh, Seshadri (28), Whalley (29), Simpson und Shaw (30) eingehend untersucht. Der γ -Pyronring geht bei der partiellen Hydrierung in die dem Cyclohexen (31) entsprechende Halbsessel-Konformation über. Der Phenylrest am C2 und die OH-Gruppe am C3 stehen in trans-Stellung zueinander (28,29). Philbin und Wheeler (32) schlagen für den Dihydro- γ -pyronring eine modifizierte Halbsessel-Konformation vor, in der mit Ausnahme des Kohlenstoffatoms C2 alle übrigen Atome in einer Ebene liegen. Diese Konformation steht im Einklang mit Er-

gebnissen, die bei der Untersuchung der Infrarot-Absorptionsspektren der Flavanone erzielt wurden (30). S i m p s o n und S h a w erklären die bathochrome Verschiebung der C=O Valenzschwingung in dem 7-Hydroxyflavanon gegen die C=O Valenzschwingung im Flavanon damit, daß der Substituent am C7 mit der Carbonylgruppe in Konjugation steht. Der Konjugationseffekt kann jedoch nur dann eintreten, wenn die Carbonylgruppe koplanar zu dem aromatischen Ring A angeordnet ist. Das ist bei der von P h i l b i n und W h e e l e r vorgeschlagenen Konformation der Fall.

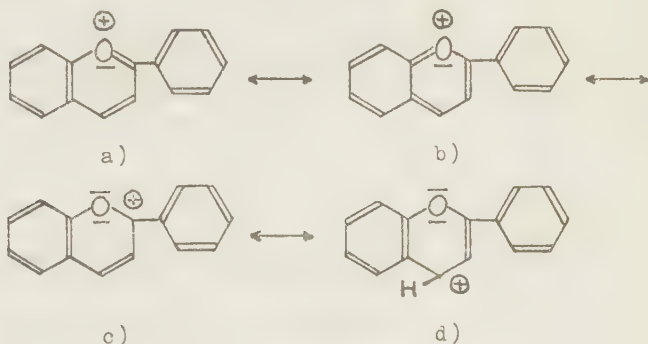
2.1.3 Anthocyanidine

Die Anthocyanidine stellen eine Gruppe von Pflanzepigmenten dar, die in der Natur, glykosodisch gebunden als Anthocyanine, die blaue und rote Färbung der Blütenblätter hervorrufen. Sie haben nach W i l l s t ä t t e r und E v e r e s t (33) die Struktur eines 2- Phenylbenzopyrylium Salzes (XXV), was durch eine Anzahl von Synthesen durch R o b i n s o n (34) bestätigt werden konnte.



Die dem Kation zugrundeliegende Struktur ist nicht

als Grundstruktur aufzufassen. Vielmehr handelt es sich hier um eine der möglichen mesomeren Grenzstrukturen, zwischen denen sich das 2-Phenylbenzopyrylium Kation stabilisiert (XXVI).

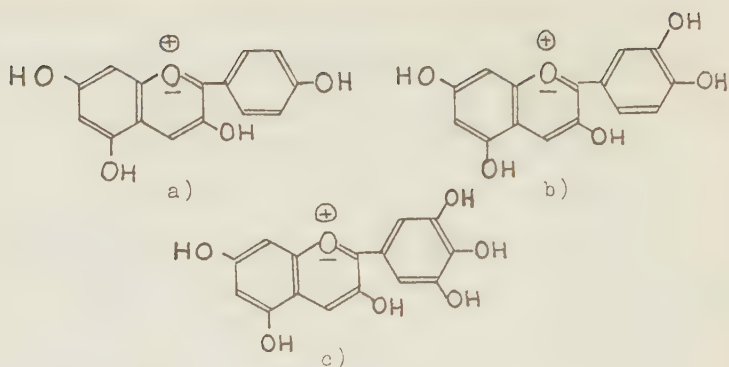


(XXVI)

Daß an der Mesomeriestabilisierung auch Carbenium - strukturen (XXVI c,d) beteiligt sind, läßt sich aus der Tatsache erkennen, daß der 2-Phenylrest am C3' leicht nitriert werden kann (35).

Die Anthocyanidine sind in ihrem Aufbau sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in der Anzahl der OH - Gruppen im Ring B. Sie werden in drei Grundtypen eingeteilt:

Pelargonidin	(XXVIIa)
Cyanidin	(XXVIIb)
Delphinidin	(XXVIIc)

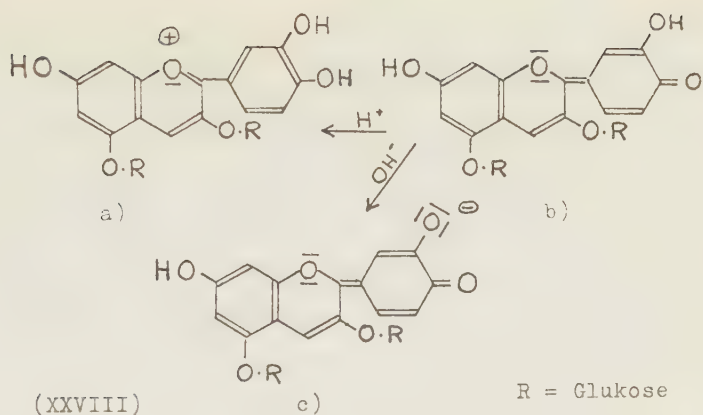


(XXVII)

Sie alle sind in 3,5,7-Stellung hydroxyliert. Die von den drei Aglukonen abgeleiteten Glykoside tragen grundsätzlich am C3, im Falle eines Diglykosides am C3 und am C5 den Zuckeranteil. Die übrigen OH-Gruppen können frei oder mit Ausnahme des C4' veräthert vorliegen.

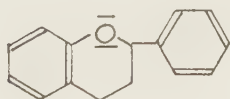
Wässrige Lösungen eines Anthocyanins zeigen auf Zugabe von Alkali einen Farbumschlag, der im Falle des Cyanins von rot über violett nach blau geht (XXVIII).

In saurer Lösung liegt das Cyanin als Kation (XXVIIIa) vor, das beim Neutralisieren in die Anhydrobase mit chinoider Struktur (XXVIIIb) übergeht. Bei weiterer Zugabe von Alkali bildet sich das blau gefärbte Cyanin Anion (XXVIIIc).

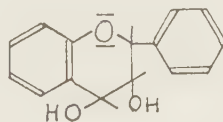


2.1.4 Leukoanthocyanidine und Catechine

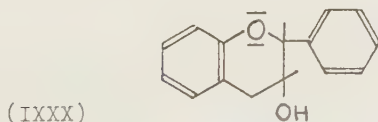
Zu den Verbindungen mit dem niedrigsten Oxydationsgrad im Ring C zählen die Leukoanthocyanidine und die Catechine. Beide sind Abkömmlinge des Flavans (IXXXa), die Leukoanthocyanidine stellen Flavan-3,4-diole (IXXXb) und die Catechine Flavan-3-ole (IXXXc) dar.



a)



b)



(IXXX)

c)

2.1.4.1 Leukoanthocyanidine

Die Struktur der natürlich vorkommenden Leukoanthocyanidine wurde von King und Bottomley (36) im Jahre 1953 endgültig aufgeklärt. Der Name Leukoanthocyanidine leitet sich von der Eigenschaft dieser farblosen Verbindungen ab, durch Kochen mit wässrigen Mineralsäuren in tief gefärbte Anthocyanidine übergeführt zu werden.

Die Leukoanthocyanidine sind formal als Reduktionsprodukte der 2,3-Dihydroflavonole aufzufassen und besitzen drei asymmetrische Kohlenstoffatome (C2, C3, C4), die zur Bildung von vier Razematen befähigt sind. Von den vier möglichen Konfigurationen überwiegen bei den natürlich vorkommenden Flavan-3,4-diolen die 2,3-cis, 3,4-cis und 2,3-cis, 3,4-trans Konfigurationen (37,38). Auf synthetischem Wege, durch Reduktion von Flavonolen (39) und 2,3-Dihydroflavonolen (40), ist es gelungen, auch die anderen noch möglichen Konfigurationen (2,3-trans, 3,4-cis und 2,3-trans, 3,4-trans) zu erhalten.

2.1.4.2 Catechine

Freudenberg (41,42,43,44) gelang im Jahre 1920 die Strukturaufklärung der Catechine. Er stellte fest, daß Catechin und Epicatechin Diastereomere sind. Die geometrischen Probleme der cis-trans Isomerie

wurden von W h a l l e y (29) und K i n g (45) gelöst. Sie konnten zeigen, daß (+) Catechin 2,3-trans und (+) Epicatechin 2,3-cis konfiguriert sind.

In beiden Fällen steht die OH-Gruppe am C3 in axialer Stellung und zeigt Wasserstoffbrückenbindung zu dem Sauerstoffatom des heterocyclischen Ringes (29,46). Diese Konformation ergibt sich aus den IR-Spektren des (+) Catechin-tetramethyläther und des (+) Epicatechin-tetramethyläther. Es resultiert eine OH-Banden Verschiebung, hervorgerufen durch Wasserstoffbrückenbindung, die jedoch nur ausgebildet werden kann, wenn die OH-Gruppe am C3 eine axiale Stellung einnimmt.

3.	<u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	30
3.1	Extraktion der Flavonverbindungen	30
3.2	Anreicherung durch fraktionierte Ausschüttelung	31
3.3	Säulenchromatographie	35
3.3.1	Chromatographie an Polyamid	35
3.3.2	Chromatographie an Zellulosepulver	38
3.4	Identifizierung der Flavone	38
3.4.1	Flavonverbindung F_2	39
3.4.1.1	Tauböck-Test	39
3.4.1.2	Zirkon-Zitronensäure-Test	41
3.4.1.3	Pc Verhalten und Identifizierung von F_2	43
3.4.1.4	Hydrolyse von F_2	46
3.4.1.4.1	Identifizierung des Zuckeranteils	46
3.4.1.4.2	Identifizierung des Aglukons von F_2	47
3.4.1.4.3	Bestimmung des Verhältnisses von Aglukon zu Zucker	52
3.4.1.5	Festlegung der Zuckerstellung	53
3.4.1.5.1	Eisen-III-chlorid-Reaktion	53
3.4.1.5.2	Reaktion mit stabilen Diazoniumsalzen	54
3.4.1.5.3	Reduktionstest mit Magnesium und Salzsäure	55
3.4.1.5.4	Methylierung von F_2	56
3.4.1.5.5	UV-Spektrophotometrische Untersuchungen	57
3.4.1.6	IR-Spektrophotometrische Untersuchungen	60
3.4.2	Identifizierung von F_3	63
3.4.2.1	Tauböck-Test	63
3.4.2.2	Zirkon-Zitronensäure-Test	63
3.4.2.3	Pc Verhalten von F_3	64
3.4.2.4	Hydrolyse von F_3	65

	<u>Seite</u>
3.4.2.4.1	Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure 65
3.4.2.4.2	Hydrolyse mit β -Glukosidase 65
3.4.2.4.3	Identifizierung der Zucker 65
3.4.2.4.4	Identifizierung des Disaccharides 66
3.4.2.4.5	Identifizierung des Aglukons 68
3.4.2.5	Stellung der Zucker 71
3.4.2.5.1	Reaktion mit stabilen Diazoniumsalzen 72
3.4.2.5.2	Partielle Hydrolyse von F_3 72
3.4.2.5.3	Methylierung von F_3 73
3.4.2.5.4	UV-Spektrophotometrische Untersuchungen 73
3.4.2.6	IR-Spektrophotometrische Untersuchungen 75
3.4.3	Identifizierung von F_4 77
3.4.3.1	Tauböck-Test, Zirkon-Zitronensäure-Test 77
3.4.3.2	Pc Verhalten von F_4 78
3.4.3.3	Hydrolyse von F_4 79
3.4.3.3.1	Identifizierung der Zucker 79
3.4.3.3.2	Identifizierung des Aglukons 81
3.4.3.4	Stellung der Zucker 85
3.4.3.5	UV-Spektrophotometrische Untersuchungen 86
3.4.4	Identifizierung von F_1 90
3.4.4.1	Tauböck-Test, Zirkon-Zitronensäure-Test 90
3.4.4.2	Pc Untersuchungen von F_1 91
3.4.4.3	UV-Spektrophotometrische Untersuchungen 92
3.4.4.4	Alkaliabbau von F_1 92
3.4.4.5	IR-Spektrophotometrische Untersuchungen 93
3.5	Diskussion 95

3. Allgemeiner Versuchsteil

3.1 Extraktion der Flavonverbindungen aus den Früchten von *Daucus carota*.

Bei der Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen ist die Wahl des Extraktionsmittels von Bedeutung. In dem pflanzlichen Ausgangsmaterial liegen die zu isolierenden Verbindungen mit anderen zusammen in Form eines vielfältigen Gemisches vor, deren Einzelkomponenten sich auf Grund ihres chemischen und physikalischen Verhaltens zu Gruppen zusammenfassen lassen. So besteht die Möglichkeit, durch Auswahl verschiedener Lösungsmittel die Inhaltsstoffe fraktioniert zu extrahieren. Im Falle der Extraktion von hydrophilen Substanzen wird zweckmäßigerweise so verfahren, daß zuerst die hydrophoben Bestandteile, wie z.B. Fette und Fettbegleitstoffe, mit unpolaren und anschließend die hydrophilen Stoffe mit polaren Lösungsmitteln entfernt werden.

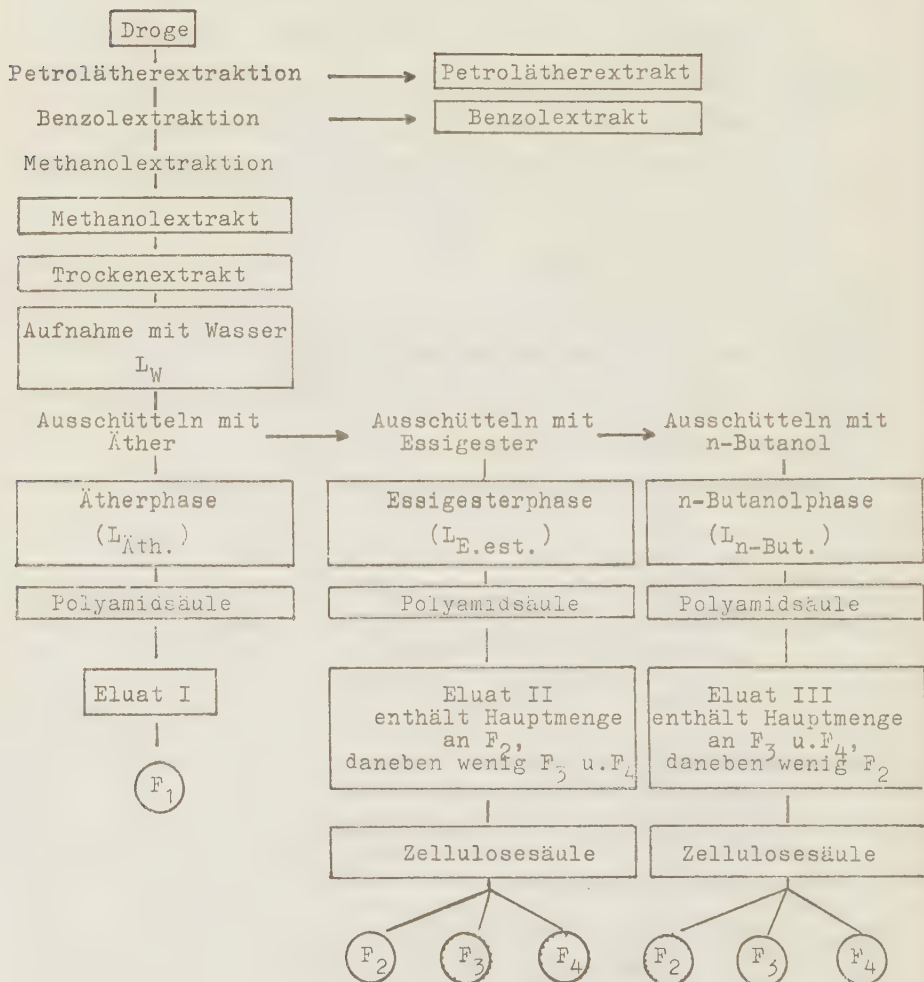
In Vorversuchen zeigte es sich, daß die erschöpfende Extraktion der Droge mit Methanol im Vergleich zu Äthanol (90%), Äthanol-Wasser (70 : 30), Essigester und n-Butanol bedeutend schneller verlief. Von den Extraktionsverfahren wurde die Perkolation der Mazeration vorgezogen. (Soxhlet-Apparat)

Die trockenen und fein zerkleinerten Früchte von *Daucus carota* wurden im Soxhlet-Apparat einer erschöpfenden Extraktion mit Petroläther und anschließend mit Benzol unterworfen, wobei die Droge von lipophilen Substanzen befreit wurde (s. Tabelle 1). Nach dieser Vorbehandlung wurde mit Methanol ausgezogen und die Extraktion so lange fortgesetzt, bis im Überlauf pc keine Flavone mehr nachweisbar waren.

3.2 Anreicherung der Flavonverbindungen durch fraktionierte Ausschüttelung mit Essigester und n-Butanol (s. Tabelle 1)

Nach dem Einengen des Methanolextraktes im Vakuum bis zur Trockne resultierte eine zähe, braune, stark aromatisch riechende Masse, die in heißem Wasser gelöst wurde. Pc Untersuchungen dieser wässrigen Phase (L_w) ergaben nach dem Besprühen mit einer alkoholischen $AlCl_3$ -Lösung neben einer Anzahl von grau und hellblau fluoreszierenden Flecken sechs mit einer gelben Fluoreszenz, die den Flavonen zuzuordnen sind. Zwei dieser Flavonflecke waren von nur schwacher Intensität und wurden als Nebenflavone im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Bestimmung der R_f -Werte der übrigen vier Flavonverbindungen in den

Tabelle 1: Extraktionsschema der Flavonverbindungen



Fließmittelsystemen Fl_{pc} 1, Fl_{pc} 2 und Fl_{pc} 3 (s. 3.4.1.3) deuteten darauf hin, daß die Verbindungen F₂, F₃, F₄ Glykoside darstellten *) (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Rf-Werte der isolierten Flavonverbindungen bei Verwendung verschiedener Fließmittel.

Fließmittel	Rf - Werte					
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	Aglukone	Glykoside
Fl _{pc} 1	0,05	0,12	0,27	0,37	0,07-0,32	0,20-0,70
Fl _{pc} 2	0,98	0,56	0,48	0,62	0,70-0,98	0,30-0,70
Fl _{pc} 3	0,85	0,39	0,3	0,44	0,45-0,91	0,30-0,80

In Abbildung 1 werden Übersichtschromatogramme der vier Flavonverbindungen in den oben angeführten Fließmittelsystemen gezeigt.

*) Die vier Flavonverbindungen werden nach steigenden Rf-Wert in dem Fließmittelsystem Fl_{pc} 1 als F₁ , F₂, F₃ und F₄ bezeichnet.

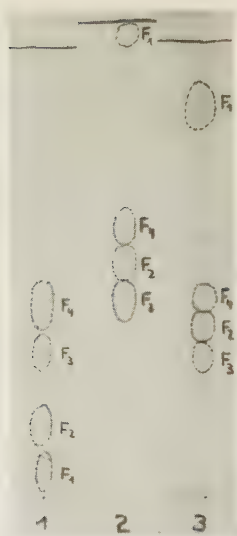


Abb. 1: Pc Verhalten der Flavonverbindungen F_1, F_2, F_3, F_4 in den in Tabelle 2 aufgeführten Fließmittelsystemen; aufsteigend
 $1 = Fl_{pc}^1, 2 = Fl_{pc}^2, 3 = Fl_{pc}^3$

Zur Abtrennung von F_1 wurde L_w erschöpfend mit Äther extrahiert und der Verlauf der Extraktion pc verfolgt. Die Ätherphase ($L_{Äth.}$) enthielt neben anderen nicht flavonoiden Substanzen nur die Flavonverbindung F_1 .

Durch anschließende Ausschüttelung von L_w mit Essigester und n-Butanol konnte eine weitere Fraktionierung der Flavone erreicht werden, wobei F_2 neben wenig F_3 und F_4 in der Essigesterphase ($L_{E-est.}$) sowie F_3 und F_4 neben Spuren von F_2 in der n-Butanolphase ($L_{n-But.}$) gefunden wurden.

Diese Phasen enthielten nicht ausschließlich Flavone, sondern waren analog $L_{Äth.}$ noch mit anderen Stoffen

verunreinigt. Pc Untersuchungen deuteten darauf hin, daß es sich bei diesen Begleitstoffen um niedere Phenole und Pflanzensäuren handelte. Eine Identifizierung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht.

Die Abtrennung der Verunreinigungen der Phasen $L_{Ath.}$, $L_{E-est.}$, und $L_{n-But.}$ wurde durch Säulenchromatographie an Polyamid als Adsorbens erreicht.

3.3 Säulenchromatographie

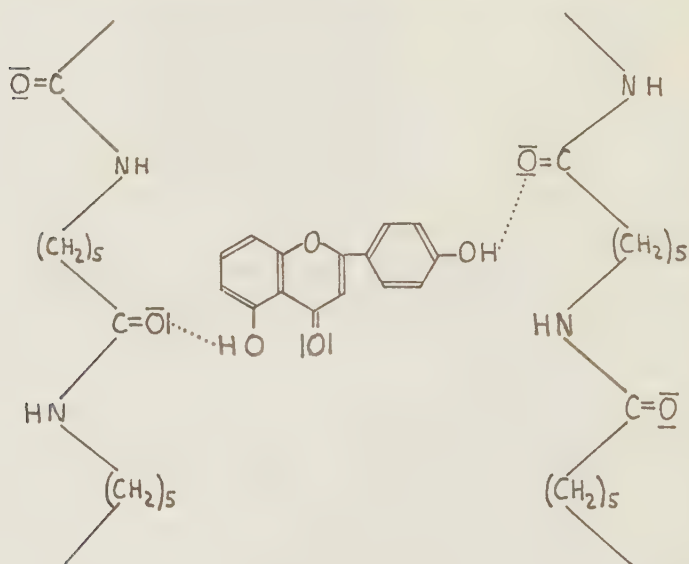
Die Säulenchromatographie, im Jahre 1936 von K a r r e r (47) erstmals auf dem Gebiet der Flavonoide zur Trennung von Anthocyaninen eingesetzt, stellt heute neben der präparativen PC (48,49,50,51) und der Gegenstromverteilung (52,53,54) die gebräuchlichste Methode zur Trennung und Vorreinigung flavonhaltiger Extrakte dar. Eine Reihe von Adsorbentien ist auf ihre Verwendungsmöglichkeit hin untersucht worden. Als geeignet erwiesen sich Polyamid, Zellulosepulver und Magnesol (55,56).

3.3.1 Chromatographie von $L_{Ath.}$, $L_{E-est.}$ und $L_{n-But.}$ an Polyamid

G r a s s m a n n und Mitarbeiter (57) bedienten sich als erste der Polyamidchromatographie bei Trennungen

im präparativen Maßstab. Diese Methode wurde von H ö r h a m m e r (58,59,60) auf dem Gebiet der Flavone angewendet.

Die Haftfestigkeit der Flavone an Polyamid ist von der Anzahl der phenolischen OH-Gruppen abhängig, die über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Sauerstoff der C=O-Gruppen des Polyamids verbunden sind (XXX).



(XXX)

Als Elutionsmittel finden hierbei Wasser, Wasser-Alkohol Gemische, Azeton, Formamid und verdünnte Laugen Verwendung. Durch Elution mit Wasser und anschließend Wasser-Alkohol Gemischen, in denen die Konzentration an Alkohol gering ist, lassen sich Verunreinigungen

gungen, wie organische Säuren, niedere Phenole und Zucker, von den Flavonen abtrennen, die ihrerseits durch Wasser-Alkohol Gemische mit steigender Konzentration an Alkohol von dem Polyamid abgelöst werden können. Die Haftfestigkeit der höheren Phenole, wie z.B. der Catechine, an Polyamid ist so groß, daß ihre Elution nur mit Formamid oder verdünnten Laugen gelingt.

In Vorversuchen erwies es sich als zweckmäßig, zunächst die Verunreinigungen mit Wasser zu eluieren und anschließend die Flavone mit Methanol von dem Polyamid zu lösen. Eine Auftrennung in die Einzelkomponenten durch Alkohol-Wasser Gemische mit steigender Konzentration an Alkohol konnte hierbei nicht erreicht werden.

Die Reinigung der Phasen, $L_{\text{Äth.}}$, $L_{\text{E-est.}}$ und $L_{\text{n-But.}}$ an Polyamid wurde in der oben beschriebenen Weise durchgeführt und brachte die folgenden Eluate:

Methanol-Eluat von $L_{\text{Äth.}}$	= Eluat I
Methanol-Eluat von $L_{\text{E-est.}}$	= Eluat II
Methanol-Eluat von $L_{\text{n-But}}$	= Eluat III

Pc Untersuchungen der Eluate ergaben, daß Eluat I die Flavonverbindung F_1 , die Eluate II und III ein Gemisch der Flavonverbindungen F_2 , F_3 und F_4 enthielten.

3.3.2 Auftrennung der Eluate II und III an Zellulosesäulen

Die Auftrennung von vorgereinigten flavonhaltigen Fraktionen erfolgt meistens durch ihre Chromatographie an Zellulosesäulen. Als Elutionsmittel finden hauptsächlich die gebräuchlichen Fließmittelsysteme der PC Verwendung (61,62,63).

Mit dem Lösungsmittelgemisch Eisessig-n-Butanol-Wasser (7 : 8 : 85) war es möglich, die Eluate II und III an Zellulose fraktioniert zu trennen. Die pc einheitlichen Fraktionen von Eluat II und III wurden zu drei Hauptfraktionen A,B und C vereinigt.

Fraktion A enthielt: Flavonverbindung F₄

Fraktion B enthielt: Flavonverbindung F₃

Fraktion C enthielt: Flavonverbindung F₂

3.4 Identifizierung der Flavonverbindungen

In Vorversuchen konnte die Vermutung, daß es sich bei den Flavonverbindungen F₂, F₃, F₄ um Glykoside handeln könne, bestätigt werden. Nach Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren kleiner Anteile der Fraktionen A, B und C waren Zucker nachweisbar. Die Flavonverbindung F₁ zeigte nach dem Behandeln mit verdünnten Säuren pc keine Veränderung. Im PC-Vergleich ergab sie mit den

Aglukonen von F_2 und F_3 Übereinstimmung in den Rf-Werten ($Fl_{pc}4$).

3.4.1 Flavonverbindung F_2 aus Fraktion C

Nach dem Einengen der Fraktion C resultierte ein gelber Rückstand, der aus Methanol-Wasser mehrmals umkristallisiert wurde. Die Substanz erweichte bei $176-180^{\circ}C$ und schmolz bei $183-184^{\circ}C$ unter Zersetzung. Beim Bestimmen des Mischschmelzpunktes mit aus natürlichem Material gewonnenem und synthetisch dargestelltem Luteolin-7 β -glukosid erfolgte keine Depression *).

3.4.1.1 Tauböck-Test

Aus der Vielzahl der meist unspezifischen Farbreaktionen sollen zur Identifizierung der Flavonverbindungen nur diejenigen herangezogen werden, die eindeutige Schlußfolgerungen auf die Konstitution der Verbindung zulassen.

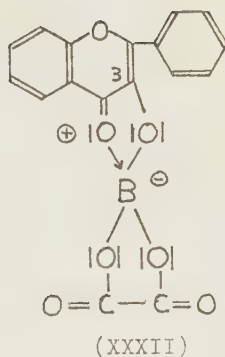
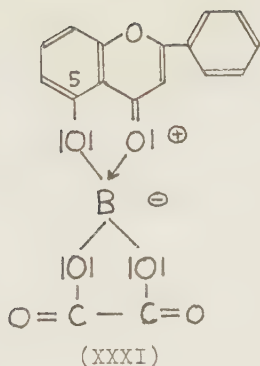
Eine von W i l s o n (64) eingeführte und von T a u b ö c k (65) modifizierte Nachweisreaktion

*) Wir danken Herrn Professor Dr. L. Hörhammer, Direktor des Institutes für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, für die freundliche Überlassung je einer Probe von aus Pflanzen isoliertem und synthetisch dargestelltem Luteolin-7 β -glukosid.

auf Flavone, die auf einer Komplexbildung der Flavone mit Borsäure in Gegenwart von zweibasischen organischen Säuren beruht, sollte diesen Autoren zufolge spezifisch die 4-Keto-5-hydroxy-Gruppierung in Flavonolen anzeigen (XXXI). Nach H ö r h a m m e r und H ä n s e l (66) zeigt der positive Ausfall des Tauböck-Tests (gelbe bis orangerote Färbung des Reaktionsproduktes) bei Flavonolen mit einer freien OH-Gruppe am C3 und C5 nur die 4-Keto-3-hydroxy-Gruppierung (XXXII) spezifisch an. Die Bildung des fünfgliedrigen Bor-Flavon-Komplexes (über OH-Gruppe am C3) scheint gegenüber der des sechsgliedrigen Bor-Flavon-Komplexes (über OH-Gruppe am C5) energetisch begünstigt zu sein. Gleiches gilt auch für die Metall-Komplexe der Flavone (67). Bei Verätherung oder Glykosidierung der OH-Gruppe am C3 kommt es bei freier OH-Gruppe am C5 zur Ausbildung des sechsgliedrigen Bor-Flavon-Komplexes. Beide Komplexe können durch die Fluoreszenz ihrer ätherischen Lösungen unter UV-Licht unterschieden werden.

Fluoreszenz der ätherischen Lösungen unter UV-Licht:

C3-OH-Bor-Flavon-Komplex	grün oder blau
C5-OH-Bor-Flavon-Komplex	gelb

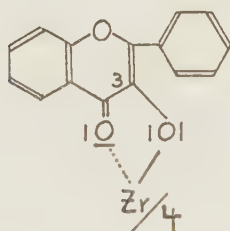


Die Reaktion wurde nach der von T a u b ö c k modifizierten Methode mit Oxalsäure durchgeführt. Hierbei fungierte das mit der Oxalsäure esterartig verbundene Bor - durch den -I Effekt der Estergruppierung verstärkt - als Lewisäure gegenüber dem Carbonylsauerstoff des Flavons. Gleichzeitig erfolgte Veresterung der Boroxalsäure mit der OH-Gruppe am C5. Daß die Bildung des Komplexes nur über die freie OH-Gruppe am C5 verlief und eine freie OH-Gruppe am C3 auszuschließen war, ergab sich aus der gelben Fluoreszenz der ätherischen Lösung des Komplexes unter UV-Licht.

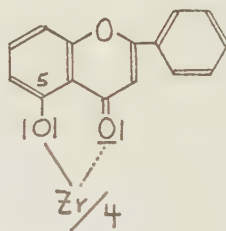
3.4.1.2 Zirkon-Zitronensäure-Test

Eine Bestätigung dieses Ergebnisses brachte der Zirkon-Zitronensäure-Test. Mittels dieser von H ö r h a m m e r

und H ä n s e l (67,68) ausgearbeiteten Reaktion ist es möglich, Aussagen über die Substitutionsverhältnisse am C3 und C5 zu machen. Die Flavone bilden je nach ihrer Konstitution mit den Zirkonium-Ionen Komplexe, die aus fünf-(XXXIII) oder sechsgliedrigen (XXXIV) Chelatringen bestehen. Sie besitzen unterschiedliche Stabilität gegenüber Zitronensäure. Hierbei ist der fünfgliedrige Chelatring der C3-OH-Flavone in Gegenwart der Zitronensäure stabiler als der sechsgliedrige der C5-OH-Flavone (67), was im Einklang



(XXXIII)



(XXXIV)

mit spektralphotometrischen Untersuchungen von J u r d und G e i s s m a n (69) über Metall-Flavon-Komplexe steht. Die bathochrome Verschiebung flavonhaltiger Lösungen auf Zugabe von Zirkonium-Ionen bleibt somit in Gegenwart von Zitronensäure nur bei den C3-OH-Flavonen bestehen.

Die Flavonverbindung F₂ zeigte auf Zusatz einer äquivalenten Menge an Zirkonoxychlorid eine Farbvertiefung, die jedoch durch Zitronensäure aufgehoben wurde. Die Möglichkeit, daß neben der freien OH-Gruppe am C5

am C3 eine glykosidierte OH-Gruppe vorlag, konnte durch diesen Test nicht ausgeschlossen werden. Hierüber brachte erst die Hydrolyse des Glykosides Aufschluß.

3.4.1.3 Pc Verhalten und Identifizierung der Flavon- verbindung F₂

Das pc Verhalten der Flavone wurde eingehend von Harborne, Bate-Smith und Wender (70,71,72,73) studiert. Bate-Smith und Westall (71) konnten zeigen, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen den R_M -Werten der Flavone und der Zahl ihrer OH-Gruppen und Zuckersubstituenten besteht. Simpson und Garden (74) dehnten diese Untersuchungen auf den Einfluß der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Pyron-Carbonyl und den OH-Gruppen am C3 und C5 auf das pc Verhalten der Flavone aus.

Die in dieser Arbeit verwandten Fließmittelsysteme sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

F₂ wurde in Fl_{pc}¹, Fl_{pc}² und Fl_{pc}³ chromatographiert und die R_f-Werte mit denen von authentischem Luteolin-7ß-glukosid verglichen. Es zeigte sich völlige Übereinstimmung der R_f-Werte. Eine Mischung von F₂ und authentischer Substanz lief in den drei Fließmittelsystemen einheitlich.

Tabelle 3: Übersicht über die verwandten Fließmittelsysteme und deren Anwendung.

Fließmittelsystem	Verhältnis V/V	Anwendung auf	Bezeichnung
Eisessig-Wasser	15 : 85	Glykoside Aglukone	Fl _{pc} ¹
Essigester-Ameisensäure-Wasser	10:2:3	Glykoside	Fl _{pc} ²
n-Butanol-Eisessig-Wasser	4:1:5	Glykoside Aglukone	Fl _{pc} ³
Eisessig-Salzsäure-Wasser	30:3:10	Aglukone	Fl _{pc} ⁴
Isopropanol-Ameisensäure-Wasser	2:5:5	Aglukone	Fl _{pc} ⁵
m-Kresol-Wasser	gesättigt	Aglukone	Fl _{pc} ⁶
Benzol-Nitromethan-Wasser	3:2:5	Methyläther	Fl _{pc} ⁷

Bei Tageslicht ließen sich die Flavone auf dem entwickelten PC nur sehr schwer als schwach gelb gefärbte Flecken erkennen. Zur besseren Sichtbarmachung der Flecke wurde das PC mit einer wässrigen Bleiazetat-Lösung, einer alkoholischen Aluminiumchlorid- und Zirkonoxychlorid-Lösung besprüht.

Unter UV-Licht war F₂ auf dem unbesprühten PC als rötlich braun fluoreszierender Fleck zu erkennen, der nach

Begasen mit Ammoniak eine leuchtend grüne Fluoreszenz annahm. Dieses Verhalten entsprach ganz dem der Flavone mit einer freien OH-Gruppe am C5. Verbindungen mit freiem Hydroxyl am C3 zeigen unbesprüht unter UV-Licht eine leuchtend gelbe Fluoreszenz, die auch beim Begasen des PC mit Ammoniak bestehen bleibt.

Beim Besprühen des PC mit Lösungen von Bleiazetat, Aluminiumchlorid und Zirkonoxychlorid erfolgten charakteristische Farbänderungen (s. Tabelle 4).

Der unter 3.4.1.2 beschriebene Zirkon-Zitronensäure-Test wurde in einer modifizierten Form auch auf dem PC ausgeführt (75). Die anfänglich rotbraune Fluoreszenz unter UV-Licht von F_2 wechselte nach Besprühen mit Zirkonoxychlorid in eine leuchtend gelbe. Durch nachfolgende Einwirkung von Zitronensäure kam es zur Auslöschung der gelben Fluoreszenz und zur Zurückbildung der rotbraunen.

Tabelle 4: Farbreaktionen der Flavonverbindung F_2 auf dem PC unter Verwendung verschiedener Sprühreagenzien.

	unbesprüht	NH_3	$AlCl_3$	$Pb(ac)_2$	$ZrOCl_2$	$ZrOCl_2 +$ Zitronensäure.
Tageslicht	(-) g	g	g	g	g	(-) g
UV-Licht	rb	gg	lg	o	lg	rb

Abkürzungen: rb = rotbraun o = ockerbraun
g = gelb (+) = stark
lg = leuchtend gelb (-) = sehr schwach
gg = grüngelb

3.4.1.4 Hydrolyse von F₂

Zur weiteren Konstitutionsaufklärung wurde F₂ der Hydrolyse unterworfen. Durch Einwirken von verdünnter Salzsäure konnte Glukose abgespalten werden. Enzymatisch war die Abspaltung von Glukose mittels β -Glukosidase möglich, womit bewiesen wurde, daß ein Flavon- β -glukosid vorlag. Der Verlauf beider Hydrolysen wurde pc verfolgt.

3.4.1.4.1 Identifizierung des Zuckeranteils

Die Identifizierung des Zuckers erfolgte in dem von den Hauptmengen an Salzsäure befreiten Hydrolysat. In einem Teil hiervon konnte pc Glukose nachgewiesen werden (s.Abb.2).

Der andere Teil des Hydrolysates diente zur Herstellung des Osazons.

Fp. des Osazons des Zucker-

anteils im Hydrolysat : 203°C

Fp. des Glukosazons : 203°C

Der Mischschmelzpunkt beider Osazone zeigte keine Depression.

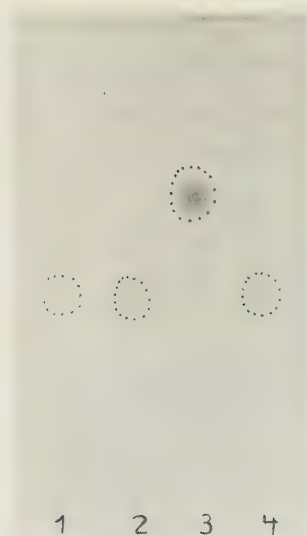


Abb. 2 Pc Nachweis der Zucker
Fließmittel: n-Butanol-Pyridin-
Wasser (6:4:3); aufsteigend
1 = Glukose
2 = Hydrolysat
3 = Rhamnose
4 = Hydrolysat + Glukose

3.4.1.4.2 Identifizierung des Aglukons von F₂

Mehrmaliges Umkristallisieren des Aglukons aus Methanol-Wasser führte zu einem Fp. von 323⁰C. Mit einer Probe reinen Luteolins ^{*)} ergab sich keine Depression.

Nach Azetylieren des Aglukons wurde für das Azetylprodukt ein Schmelzpunkt von 225⁰C gefunden. Der

^{*)} Auch an dieser Stelle sei Herrn Professor Dr.L. Hörhammer, Direktor des Institutes für Pharmazeutische Arzneimittellehre, Universität München, für die Bereitstellung einer Probe reinen Luteolins gedankt.

Der Schmelzpunkt von vollständig azetyliertem Luteolin liegt bei 225°C.

Pc erwies sich das Aglukon in den Fließmittelsystemen Fl_{pc}4 und Fl_{pc}5 (s. Abb. 3) als identisch mit Luteolin. Die Zirkon-Zitronensäure-Reaktion, als PC-Sprühtest angewandt, ergab keinen Hinweis auf eine freie OH-Gruppe am C3.

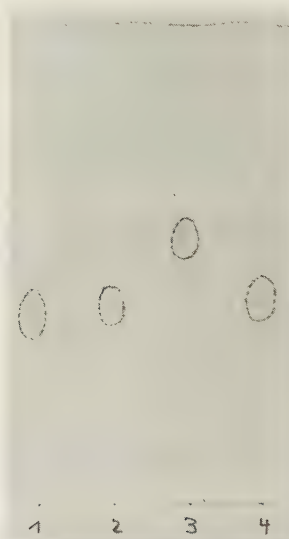
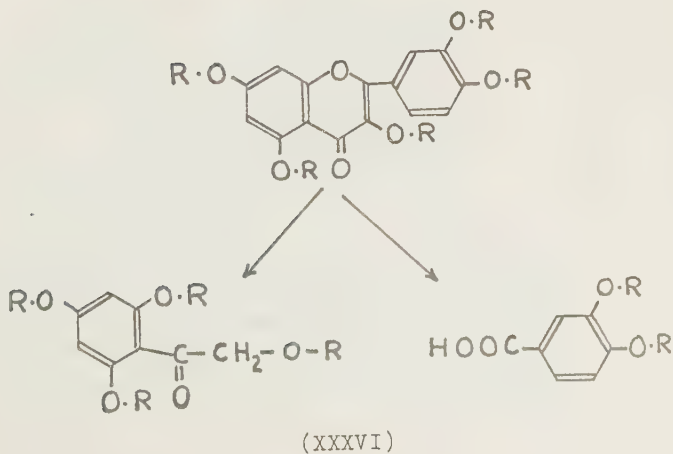
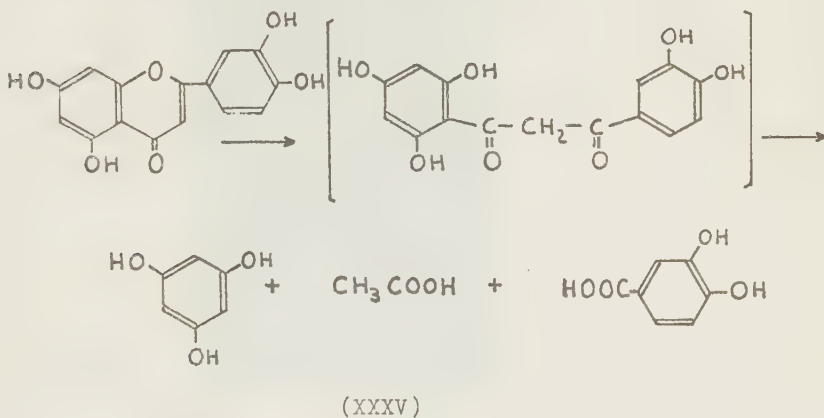


Abb. 3 Pc Identifizierung des Aglukons von F₂
Fließmittel: Fl_{pc}5; aufsteigend
1 = Authentisches Luteolin
2 = Aglukon von F₂
3 = Authentisches Apigenin
4 = Aglukon von F₂ + auth. Luteolin

Die Übereinstimmung des Aglukons mit Luteolin ließ sich ebenfalls durch den Abbau mit Alkalihydroxyd beweisen (76,77).

Durch Schmelze mit Alkalihydroxyd erfahren die Flavone eine Spaltung im heterocyclischen Ring C. Während hierbei als Spaltprodukte mehrwertige Phenole (XXXV) auftreten, führt die Spaltung der 3-Alkoxyflavone unter milderen Bedingungen zu -Alkoxyazetophenonen und Phenolcarbonsäuren. Die 3-Hydroxyflavone werden zum Nachweis über ihre Alkali-Abbauprodukte zunächst alkyliert und dann über die entsprechenden -Alkoxyazetophenone und aromatischen Carbonsäuren identifiziert (XXXVI).



Durch Natriumhydroxydschmelze konnten die Abbauprodukte des Aglukons pc (s. Abb. 4) Phlorogluzin und Protocatechusäure nachgewiesen werden. Eine Spaltung des Aglukons unter mildereren Bedingungen in Derivate des Azetophenons trat nicht ein. Eine Alkoxygruppierung am C3 war somit auszuschließen.

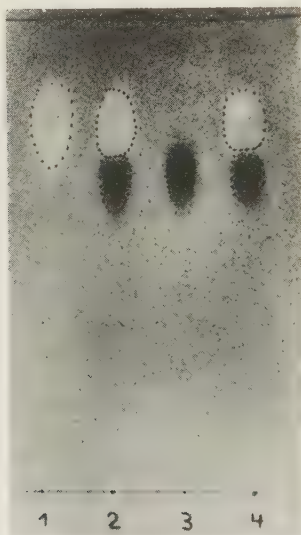


Abb. 4 Pc Identifizierung der Alkali-
Abbauprodukte.

Fließmittel: Fl_{pc}3 ; aufsteigend

- 1 = Protocatechusäure
- 2 = Alkali-Abbauprodukte
- 3 = Phlorogluzin
- 4 = Alkaliabbauprodukte + Phloro-
gluzin + Protocatechusäure.

Hieraus ergab sich, daß das Aglukon im Ring A am C5 und C7, im Ring B am C3' und C4' durch OH-Gruppen substituiert war. Diese Substitutionsverhältnisse entsprechen denen des Luteolins (5,7,3',4'- Tetrahydroxyflavon).

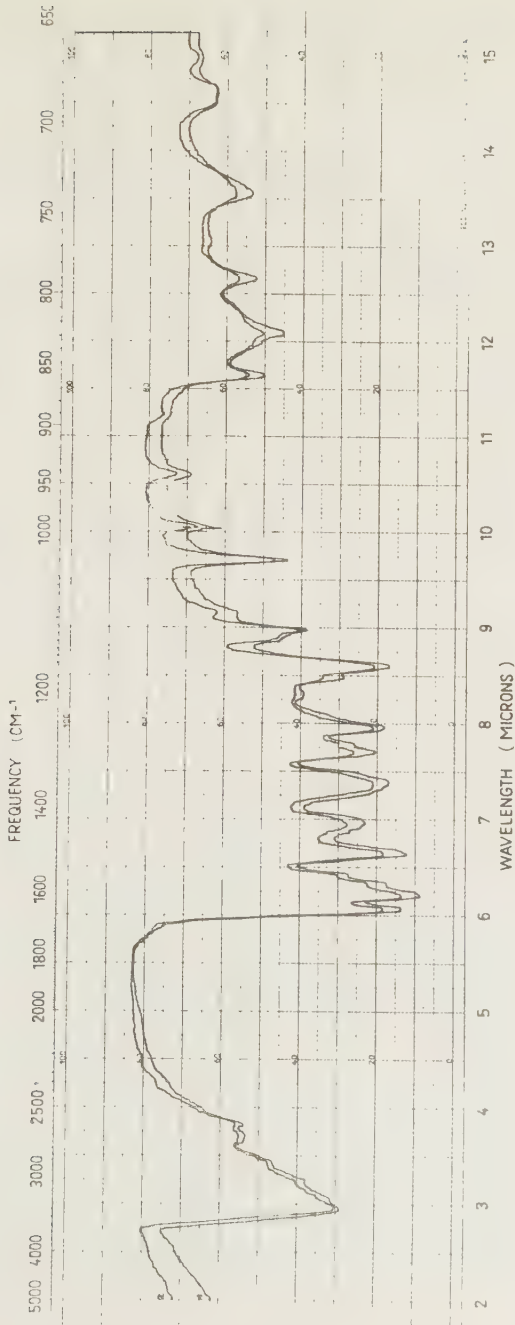


Abb. 5 IR-Spektren des Aglukons von $F_2(1)$ und einer Probe
authentischen Luteolins (2) in KBr.

Zur weiteren Sicherstellung der Struktur wurde der Vergleich der IR-Spektren des Aglukons und des authentischen Luteolins in KBr herangezogen (s. Abb. 5). Die Spektren stimmten in ihrem Verlauf überein und zeigten folgende kennzeichnenden Absorptionsbanden:

<u>1653 cm⁻¹</u>	: C=O Valenzschwingung der Carbonylgruppe des heterocyclischen Ringes C
<u>860 cm⁻¹, 829 cm⁻¹</u>	: -CH Waggingschwingung des Ringes B

Das Auftreten einer starken Bande in Bereich von 800 cm⁻¹ bis 860 cm⁻¹ und einer mittleren Bande zwischen 860 cm⁻¹ und 900 cm⁻¹ deutet auf einen 1,2,4-substituierten Benzolring hin (Seitenphenylrest).

7.4.1.4.3

Bestimmung des Verhältnisses von Aglukon zu Zucker

Zur Klärung der Frage, ob dem Glykosid die Struktur eines Monosides oder die eines Biosides zuzuordnen war, wurde die Menge an Glukose bestimmt, die glykosidisch gebunden vorlag. Das erfolgte dadurch, daß nach Totalhydrolyse des Glykosides das Aglukon gravimetrisch bestimmt wurde. Aus der Differenz zur Einwaage des Glykosides ergab sich die Menge an Glukose. Auf Grund des ermittelten Luteolinanteils von 63,12% - entsprechend 36,88% Glukose - war dem Glykosid die

Struktur eines Monosides zuzuordnen.

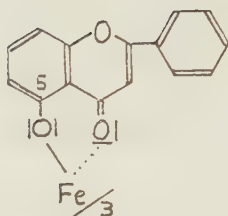
3.4.1.5 Festlegung der Zuckerstellung

Nach Identifizierung des Aglukons als Luteolin mußte nun geklärt werden, an welcher OH-Gruppe des Aglukons die Verknüpfung mit der Glukose vorlag. Hierzu wurden die folgenden Reaktionen herangezogen.

3.4.1.5.1 Eisen-III-chlorid-Reaktion in alkoholischer Lösung

Eine Bestätigung des Zirkon-Zitronensäure-Tests, der eine freie OH-Gruppe am C5 des Glykosides anzeigte, erfolgte durch die Eisen-III-chlorid-Reaktion in alkoholischer Lösung.

Eisen-III-chlorid bildet mit der tautomeren Enolform einer β -Dicarbonylverbindung gefärbte, zyklisch gebaute Komplexsalze (78), die nach Briggs und Locker (79) im Fall von Flavonen mit einer freien OH-Gruppe am C5 grün gefärbt sind (XXXVII).



(XXXVII)

3.4.1.5.2 Reaktion mit(stabilen)Diazoniumsalzen

Neu (80) hat zum pc Nachweis der Flavone verschiedene stabile Diazoniumsalze^{*)} eingeführt und konnte zeigen, daß die Konstitution der Diazoniumverbindungen und diejenige der Flavone von Einfluß auf die Farbstoffbildung ist (81). Flavone, die in C7-Stellung veräthert oder glykosidiert sind, reagieren nicht mit den betr. Diazoniumsalzen im Gegensatz zu solchen, die eine freie OH-Gruppe am C7 und C5 besitzen.

Beim Besprühen des Flavonglykosides und seines Aglukons mit einer Lösung von Echtblausalz BB^{*)} färbte sich nur das Aglukon an. Eine Glykosidierung am C7 erschien somit wahrscheinlich.

*) Echtblausalz K (Diazotiertes 4-Amino-3,6-dimethoxy-4'-nitro-azobenzol

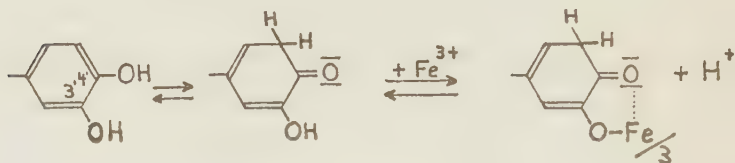
Echtblausalz BB (Diazotiertes 1-Amino-4-benzoylamido-2,5-diäthoxybenzol

3.4.1.5.3 Reduktion des Flavonglykosides mit Magnesium und Salzsäure

Um eine Glykosidierung der OH-Gruppen im Seitenphenylrest auszuschließen, wurde das Glykosid mittels Magnesium und Salzsäure in alkoholischer Lösung zu dem entsprechenden Anthocyan reduziert (82,83,84,85,86,87,88,89). Die rötliche Färbung der Lösung schlug auf Zusatz von Natriumazetat nach violett um (XXVIII b), während die Zugabe von Natriumkarbonat tiefe Blaufärbung hervorrief (XXVIII c). Bei diesen Reaktionen erfolgte eine Umlagerung der Flavyliumform (XXVIII) mit benzoidem Seitenphenylrest in die Phenolatform (XXVIII b,c) mit chinoidem Seitenphenyl, was jedoch nur im Falle einer freien OH-Gruppe am C4'möglich ist.

Da Eisen-III-chlorid in alkoholischer Lösung nicht nur mit β -Enolen (C5-OH-Flavone) sondern auch mit ortho-Enolen (88) (C3-OH-Flavone) gefärbte Komplexsalze bildet, und zum anderen durch Reduktion der Carbonyl-Gruppe die Möglichkeit der Ausbildung eines grün gefärbten Komplexes am C4 und C5 aufgehoben war, mußte, wenn im Seitenphenylrest eine freie ortho-Dihydroxy-Gruppierung vorlag, in neutraler bis höchstens schwach saurer Lösung auf Zugabe von Eisen-III-Ionen eine Komplexbildung erfolgen. Der Farbumschlag der Lösung nach blau auf Zusatz von Eisen-III-Ionen, deutete auf eine

solche Komplexbildung und somit auf eine freie ortho-Dihydroxy-Gruppierung im Seitenphenylrest hin (XXXVIII).



(XXXVIII)

3.4.1.5.4 Methylierung des Flavonglykosides

Zur Erhärtung dieser Hinweise wurde das Flavonglykosid vollständig methyliert und anschließend der Zuckeranteil mit verdünnter Salzsäure abgespalten. Es erwies sich als vorteilhaft, die Methylierung mit Dimethylsulfat im Überschuß und mit Kaliumkarbonat in getrocknetem Aceton durchzuführen (90,91). Bei Anwendung dieser Methode wird auch die C5-OH-Gruppe methyliert, die auf Grund der Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carbonylsauerstoff (74,92) mit Diazomethan und Methylhalogeniden nur schwer methylierbar ist (93,94). Das methylierte Spaltprodukt wurde mit 5,3',4'-Trimethoxyluteolin das durch Methylierung und anschließender Hydrolyse aus authentischem Luteolin-7-glykosid dargestellt wurde, pc in Fl_{pc}⁷ verglichen:

Rf-Wert des methylierten Spaltproduktes von F₂ in Fl_{pc}⁷ lag bei 0,34.

Rf-Wert des methylierten Spaltproduktes von authentischem Luteolin-7-glykosid in Fl_{pc}⁷ lag ebenfalls bei 0,34.

Eine Mischung beider Substanzen lief in Fl_{pc}⁷ einheitlich.

3.4.1.5.5 UV-Spektrophotometrische Untersuchungen

Spektrophotometrische Messungen der Flavone in Gegenwart von geschmolzenem Natriumazetat (95,96), in einer Mischung von Borsäure und Natriumazetat (97) und in Natriumäthylat (98,99) zeigen Verschiebungen in der Lage und der Intensität der Maxima, wobei das Ausmaß der Verschiebung von der Stellung der funktionellen Gruppen im Molekül abhängt. Das typische Flavonspektrum besteht aus zwei Banden, deren Maxima zwischen 320 und 350 m/ μ (Bande I) und zwischen 240 und 270 m/ μ (Bande II) liegen (100). Die Absorption im Benzo- γ -pyrondsystem wird Bande II, diejenige im Ring B der Bande I zugeordnet. Da die Lage und Intensität der Maxima weitgehend von dem Maß der Beteiligung bestimmter mesomerer Grenzformen an der Gesamtmesomerie des Moleküls abhängt, kommt es z.B. durch Verschiebung des pH-Wertes oder durch den Einfluß von Komplexbildnern zur

Veränderung der relativen Beteiligung dieser Grenzformen, so daß letztlich daraus eine charakteristische Verschiebung der Maxima resultiert (101). So kann ein Flavon mit einer freien OH-Gruppe am C7 von einem mit einer verätherten oder glykosidierten OH-Gruppe am C7 dadurch unterschieden werden, daß ersteres in Gegenwart von Natriumazetat, das gegenüber einer freien OH-Gruppe am C7, C3 und C4' hinreichend basisch (74, 92, 102) ist, um diese zu ionisieren, eine bathochrome Verschiebung des Maximums der Bande II zeigt (8-20 m μ). Freie ortho-Dihydroxy-Gruppierungen im Seitenphenylrest lassen sich durch eine bathochrome Verschiebung der Maxima von Bande I auf Zusatz von Borsäure und Natriumazetat erkennen (15-30 m μ).

Es wurden die UV-Spektren des Glykosides und seines Aglukons in Äthanol aufgenommen und die bathochrome Verschiebung der Maxima bei Zusatz von Natriumazetat und von Borsäure-Natriumazetat bestimmt (s.Tab.5, Abb.6).

Tabelle 5: UV-Absorptionsmaxima des Flavonglykosides F₂ und des zugehörigen Aglukons.

Substanz	Äthanol		Äthanol + Natriumazetat				Äthanol + Borsäure + Natriumazetat			
	m μ	m μ	m μ	m μ	Δ m μ	Δ m μ	m μ	m μ	Δ m μ	Δ m μ
F ₂	350	255	402	255	52	0	375	256	25	1
Aglukon (Luteolin)	350	254	385	265	35	11	373	258	23	4

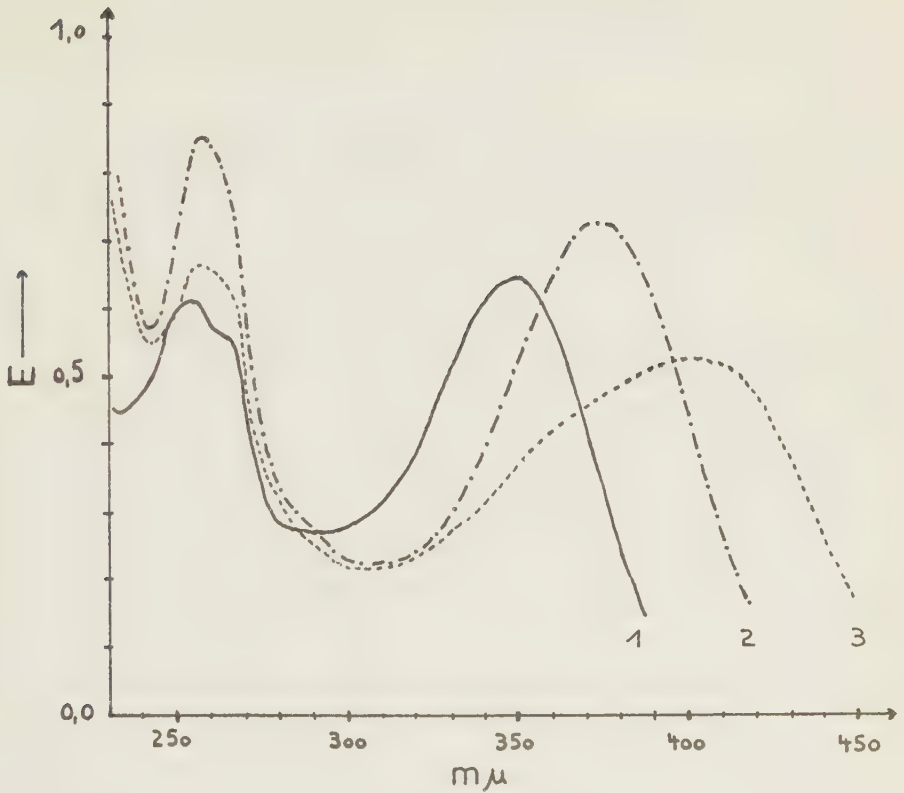


Abb. 6: UV-Absorptionsspektren des Flavonglykosides F₂

- 1 = Flavonglykosid F₂ in Äthanol
- 2 = Flavonglykosid F₂ in Äthanol in Gegenwart von Borsäure und Natriumazetat
- 3 = Flavonglykosid F₂ in Äthanol in Gegenwart von Natriumazetat

Das Ausmaß der Verschiebung sprach für eine Glykosidierung am C7.

3.4.1.6 IR-Spektroskopische Untersuchungen des Flavon-glykosides F₂

IR-spektroskopische Untersuchungen von Flavonen wurden auf breiter Basis von I n g l e t t (103), H e r - g e r t h und K u r t h (104), L o o k e r (105) und in letzter Zeit von H ö r h a m m e r und W a g - n e r (106) durchgeführt. Sie konnten zeigen, daß die C=O Bande, die bei dem unsubstituierten Flavon bei 1650 cm^{-1} liegt, durch Einführen einer OH-Gruppe am C3, C7 und C4' eine Verschiebung nach 1600 cm^{-1} erfährt. Erfolgt die OH-Gruppensubstitution hingegen am C5, C7 und C4', so wurde keine oder nur eine geringe C=O Bandenverschiebung beobachtet. Hier wird durch den Einfluß der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe am C5 und dem Carbonylsauerstoff der Konjugationseffekt der Substituenten am C7 und C4' weitgehend zurückgedrängt, was sich in keiner oder nur einer geringen C=O Bandenverschiebung ausdrückt. Kommt es durch Verätherung am C5 zu keiner Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung, so kann der Konjugationseffekt wieder ungehindert in Erscheinung treten, und die C=O Bande zeigt wieder eine bathochrome Verschiebung. Flavone mit freien OH-Gruppen am C5 und C3 haben die C=O Bande zwischen

1650 cm^{-1} und 1660 cm^{-1} . Aus der Lage der C=O Bande lassen sich begrenzt Aussagen über die Substitutionsverhältnisse machen.

Die Aufnahme des IR-Spektrums von F₂ erfolgte in KBr; sie war mit der einer Probe authentischen Luteolin-7 β -glukosides identisch (s. Abb. 7).

1553 cm^{-1} : C = O Valenzschwingung der Carbonylgruppe.

Aufgrund der oben gemachten Aussagen war dem Flavonglykosid F₂ die Struktur eines Luteolin-7 β -glukosides zuzuordnen.

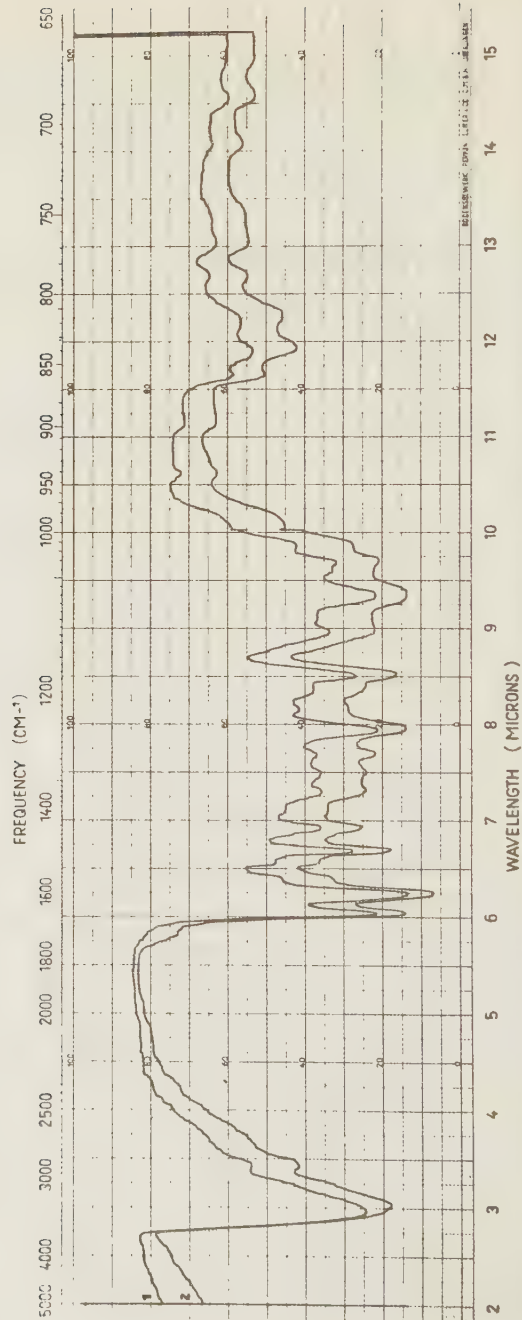


Abb. 7 IR-Spektren des Flavanglykosides F_2 (1) und des authentischen Luteolin-7 β -glukosides (2) in KBr.

3.4.2 Identifizierung des Flavonglykosides F₃

F₃ wurde nach dem Einengen der Fraktion B aus Äthanol umkristallisiert. Die Substanz begann unter Farbvertiefung bei 210°C zu schmelzen und zer setzte sich bei 227°C.

3.4.2.1 Tauböck Test (64,65,66)

Zur Klärung der Substitutionsverhältnisse am C3 und C5 wurde die Verbindung dem Tauböck-Test unterworfen. Die gelbe Fluoreszenz der ätherischen Lösung des gebildeten Bor-Oxalsäure-Flavonkomplexes unter UV-Licht deutete auf eine freie OH-Gruppe am C5 hin.

3.4.2.2 Zirkon-Zitronensäure-Test (67,68)

Eine Erhärtung dieser Annahme ergab sich aus dem Zirkon-Zitronensäure-Test. Die anfänglich eingetretene Farbvertiefung auf Zusatz von Zirkon-oxychlorid wurde durch Zitronensäure aufgehoben, was für die Existenz einer freien OH-Gruppe am C5 sprach.

Die Möglichkeit einer Glykosidierung am C3 konnte sowohl mit dem Tauböck-Test als auch mit dem Zirkon-Zitronensäure-Test nicht ausgeschlossen werden.

3.4.2.3

Pc Verhalten der Flavonverbindung F₃

3.4.2.4 Hydrolyse von F₃

Zur Bestimmung des Zuckeranteils wurde F₃ unter verschiedenen Bedingungen hydrolysiert.

3.4.2.4.1 Hydrolyse von F₃ mit verdünnter Salzsäure

Durch mehrstündiges Hydrolysieren mit verdünnter Salzsäure war es möglich, Glukose und Rhamnose abzuspalten. Wurde die Hydrolyse jedoch nach maximal 5 Minuten unterbrochen, so war in dem Hydrolysat nur Rhamnose nachweisbar.

3.4.2.4.2 Hydrolyse von F₃ mit β -Glukosidase

Das Einwirken von β -Glukosidase führte zur Abspaltung eines Disaccharides, das im weiteren Verlauf als Rutinose identifiziert werden konnte. Gleichzeitig konnte hierdurch bewiesen werden, daß die Glukose in dem Disaccharid mit dem Aglukon β -glykosidisch verknüpft ist.

3.4.2.4.3 Identifizierung der Zucker

Die Identifizierung der Zucker erfolgte auf pc Wege. In dem Fließmittelsystem n-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3) zeigten sie mit Proben von reiner Glukose und Rhamnose Übereinstimmung inden Rf-

Werten (s. Abb. 8). Eine Mischung des Hydrolysates mit Glukose und Rhamnose ergab pc 2 einheitliche Flecken.



Abb. 8

Pc Nachweis der Zucker

Fließmittel: n-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3); aufsteigend

1 = Glukose

2 = Hydrolysat

3 = Rhamnose

4 = Hydrolysat + Glukose + Rhamnose

3.4.2.4.4 Identifizierung des Disaccharides als Rutinose

Zur Klärung der Struktur des Disaccharides wurde das Flavonglykosid F_3 mit Methyljodid und Silberoxid in Dimethylformamid permethyliert (107) und das Meythylprodukt anschließend mit verdünnter

Salzsäure hydrolysiert. Die Identifizierung der Methylzucker als 2,3,4-Tri-O-methylglukose und 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose erfolgte durch pc Vergleich mit den Zuckerspaltprodukten von permethyliertem Rutin bei Verwendung von Dimethylsulfoxid als stationärer und Diisopropyläther mit Dimethylsulfoxid gesättigt als mobiler Phase (108,109)(s.Abb.9). Aus der Übereinstimmung der Rf-Werte ergab sich, daß dem Disaccharid die Struktur der Rutinose zuzuordnen war.

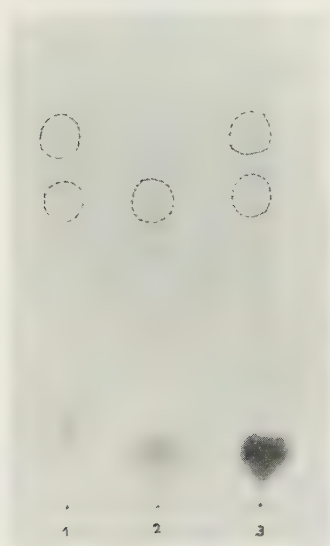


Abb. 9 Pc Vergleich der Methylzucker

Fließmittel: Diisopropyläther mit Dimethylsulfoxid gesättigt, absteigend

- 1 = Methylzuckergemisch aus permethyliertem F₃
- 2 = 2,3,4-Tri-O-methylrhamnose
- 3 = Methylzuckergemisch aus permethyliertem Rutin

Die Identität mit Rutinose konnte ebenfalls durch pc Vergleich des Enzym-Hydrolysates mit Rutinose, die durch Hydrolyse von authentischem Rutin dargestellt wurde, bewiesen werden (s.Abb.10).

Rhamnose

Glukose

Rutinose

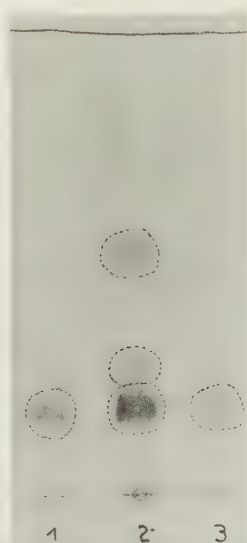


Abb. 10 Pc Nachweis der Rutinose

Fließmittel: n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1); aufsteigend

1 = Hydrolysat von F₃

2 = Hydrolysat von Rutin

3 = Hydrolysat von F₃

3.4.2.4.5 Identifizierung des Aglukons

Das Aglukon zeigte nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser einen Schmelzpunkt von 323°C und ergab im Mischschmelzpunkt mit reinem Luteolin keine Depression.

Der Schmelzpunkt des Azetylproduktes lag bei 225°C

(Tetraazetyluteolin Fp. 225°C).

Bei pc Untersuchungen in den Fließmittelsystemen Fl_{pc}^4 und Fl_{pc}^5 verhielt sich das Aglukon entsprechend einer Probe reinen Luteolins. Die Sichtbarmachung erfolgte mit den unter 3.4.1.3 beschriebenen Sprühreagenzien.

Der Zirkon-Zitronensäure-Test auf dem PC angewandt, ergab keinen Hinweis auf eine freie OH-Gruppe am C3.

Zur Sicherung dieser Ergebnisse wurde das Aglukon dem Alkaliabbau (76,77) unterworfen und sein IR-Spektrum mit dem einer Probe authentischen Luteolins verglichen. Als Abbauprodukte mit Alkalihydroxyden waren pc in Fl_{pc}^3 Phlorogluzin und Protocatechusäure nachweisbar (XXXV).

Die IR-Spektren stimmten in ihrem Verlauf überein und hatten folgende kennzeichnenden Absorptionsbanden:

<u>1653 cm⁻¹</u>	: C=O Valenzschwingung der Carbonylgruppe des heterocyclischen Ringes C.
<u>860 cm⁻¹, 829 cm⁻¹</u>	: -CH Waggingschwingung des Ringes B (s.Abb.11)

Auf Grund dieser Ergebnisse war dem Aglukon die Struktur des Luteolins zuzuordnen.

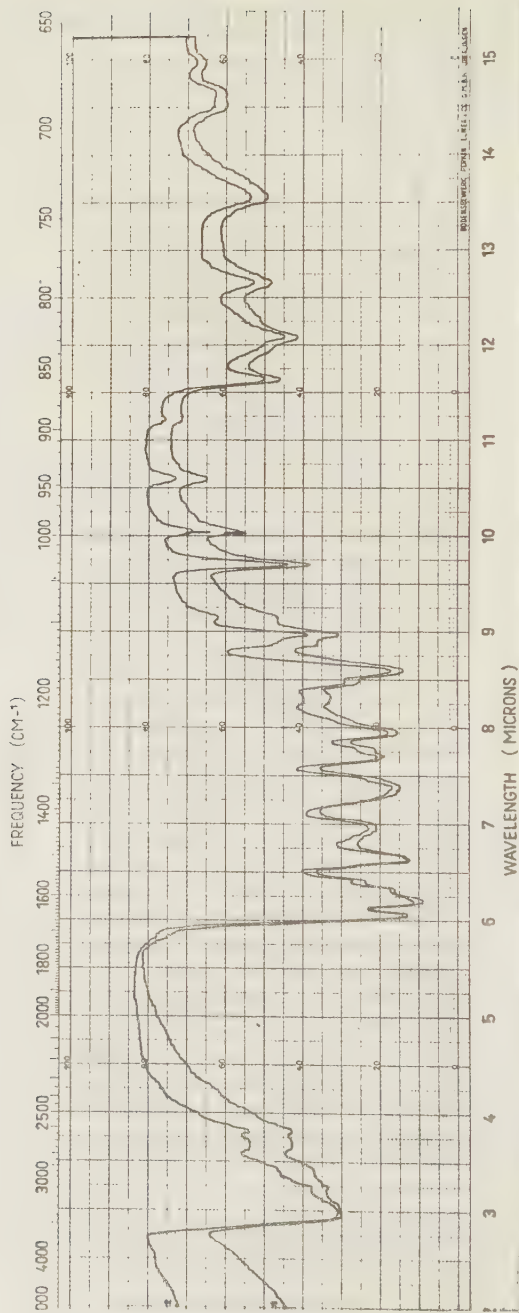


Abb. 11 IR-Spektren des Aglukons von F_3 (1) und einer Probe authentischen Luteolins (2) in KBr.

3.4.2.5 Stellung der Zucker

Eine Glykosidierung des Luteolins am C5, C4' und C3' konnte durch folgende Reaktionen ausgeschlossen werden.

1.) Tauböck-Test

Die gelbe Fluoreszenz der ätherischen Lösung des gebildeten F_3 -Bor-Oxalsäure-Komplexes war für eine freie OH-Gruppe am C5 beweisend.

2.) Zirkon-Zitronensäure-Test (vor und nach der Hydrolyse ausgeführt) (67,68)

Zitronensäure hob die durch Zirkonium-Ionen gebildete Farbvertiefung einer alkoholischen Lösung von F_3 und einer solchen des zugehörigen Aglukons auf.

3.) Reaktion mit Eisen-III-chlorid in alkoholischer Lösung (78,79)

F_3 zeigte auf Zugabe von Eisen-III-chlorid in alkoholischer Lösung eine Grünfärbung, was für eine freie OH-Gruppe am C5 beweisend war.

4.) Reduktion von F_3 mit Magnesium und Salzsäure (88,89)

Die rötliche Lösung des Reduktionsproduktes von F_3 färbte sich auf Zusatz von:

- | | | |
|----------------------------|-----|----------|
| a) Natriumazetat | --- | violett |
| b) festem Natriumkarbonat | --- | tiefblau |
| c) Eisen-III-chloridlösung | --- | blau |

Aus a) und b) wurde auf eine freie OH-Gruppe am C4' und aus c) auf eine freie ortho-Dihydroxy-Gruppierung am C3' und C4' geschlossen.

5.) Borsäure und Natriumazetat in Äthanol

Bande I des UV-Spektrums von F_3 zeigte eine bathochrome Verschiebung in Gegenwart von Borsäure und Natriumazetat, was ebenfalls für eine freie ortho-Dihydroxy-Gruppierung im Seitenphenylrest beweisend war. (s. Abb. 12 und Tab. 7)

Nach Ausschluß der Glykosidierung am C5, C3' und C4' mußte die Verknüpfung des Disaccharides mit dem Aglukon am C7 erfolgt sein.

3.4.2.5.1 Reaktion mit (stabilen) Diazoniumsalzen (80,81)

Zum Beweis der Glykosidierung am C7 wurde F_3 und das Aglukon auf dem PC mit einer Lösung von Echtblausalz BB angesprüht. Hierbei erfolgte eine Farbstoffbildung nur mit dem Aglukon, was sich dadurch erklären läßt, daß die OH-Gruppe am C7 des Flavonglykosides F_3 durch Glykosidierung blockiert ist.

3.4.2.5.2 Partielle Hydrolyse von F_3

Partielle Hydrolyse von F_3 ergab eine Aufspaltung in Rhamnose und Luteolin-7-glukosid. Letzteres konnte pc in den Fließmittelsystemen Fl_{pc}^1 ,

Fl_{pc}² und Fl_{pc}³ durch Vergleich mit reinem Luteolin-7-glukosid identifiziert werden.

3.4.2.5.3 Methylierung von F₃ (90,91)

Die Hydrolyse des methylierten Glykosides führte zu einem Trimethoxyluteolin, das pc in Fließmittelsystem Fl_{pc}⁷ mit 5,3',4'-Trimethoxyluteolin - aus authentischem Luteolin-7-glukosid dargestellt - identisch war.

3.4.2.5.4 UV-Spektrophotometrische Untersuchungen (95,96)

Eine Bestätigung dieser Resultate erbrachten UV-Absorptionsmessungen des Glykosides und seines Aglukons in reinem Äthanol und in Gegenwart von Natriumazetat (s.Abb. 12 und Tab. 7).

Bande II des Glykosides zeigte im Gegensatz zu dem Aglukon keine bathochrome Verschiebung, wodurch die Glykosidierung am C7 sichergestellt werden konnte.

Tabelle 7: UV-Absorptionsmaxima des Flavonglykosides und des zugehörigen Aglukons.

Verbindung	Äthanol		Äthanol + Na-azetat				Äthanol+Borsäure +Na-azetat			
	m/u	m/u	m/u	m/u	Δ m/u	Δ m/u	m/u	m/u	Δ m/u	Δ m/u
F ₃	350	255	406	256	+56	+ 1	375	258	+25	+ 3
Aglukon (Luteolin)	350	255	385	265	+35	+10	374	258	+24	+3

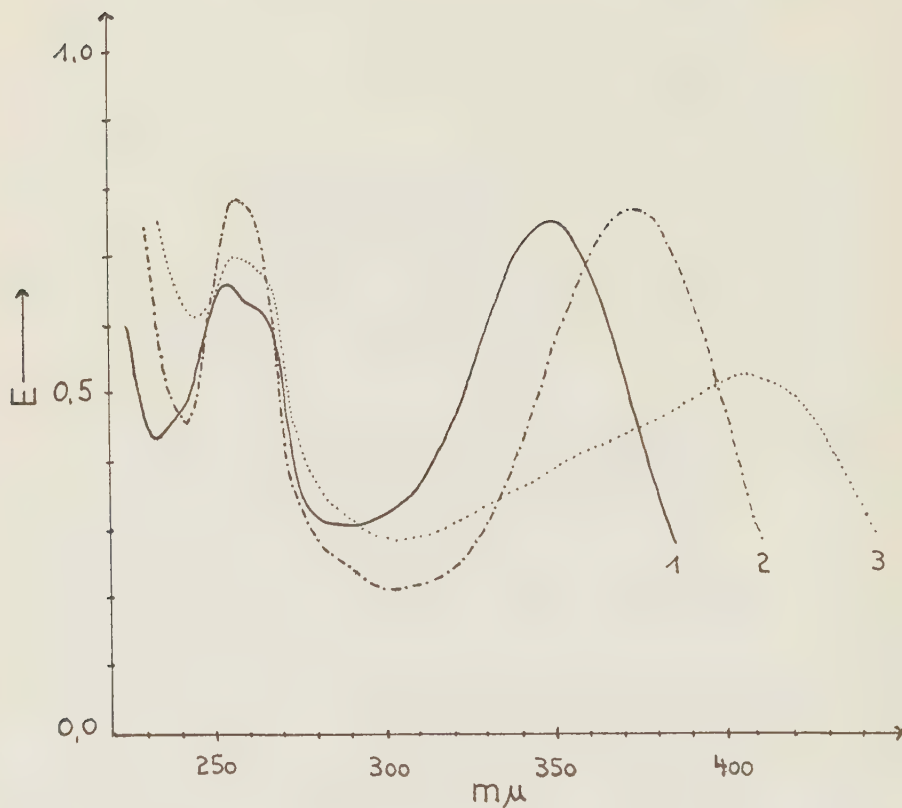


Abb. 12 UV-Absorptionsspektren des Flavonglykosides F_3

- 1 = Flavonglykosid F_3 in Äthanol
- 2 = Flavonglykosid F_3 in Äthanol in Gegenwart von Borsäure und Natriumazetat
- 3 = Flavonglykosid F_3 in Äthanol in Gegenwart von Natriumazetat

3.4.2.6 IR-Spektroskopische Untersuchungen von F₃

Das IR-Spektrum wurde in KBr aufgenommen und zeigte eine Carbonylbande bei 1653 cm^{-1} . Die Lage der Carbonylbande stimmte mit der des Aglukons und der des Luteolin-7-glukosides überein. Abweichungen im Verlauf des Spektrums von dem des Luteolin-7-glukosides ergaben sich in dem Bereich um 3000 cm^{-1} und zwischen 1150 cm^{-1} und 950 cm^{-1} . Aus dem Verlauf der beiden Spektren konnte auf die enge Verwandtschaft der Flavonglykoside F₂ und F₃ geschlossen werden (s. Abb 13).

Nach den vorstehenden Ausführungen war dem Flavonglykosid F₃ die Struktur eines Luteolin-7-rhamnoglukosides zuzuordnen.

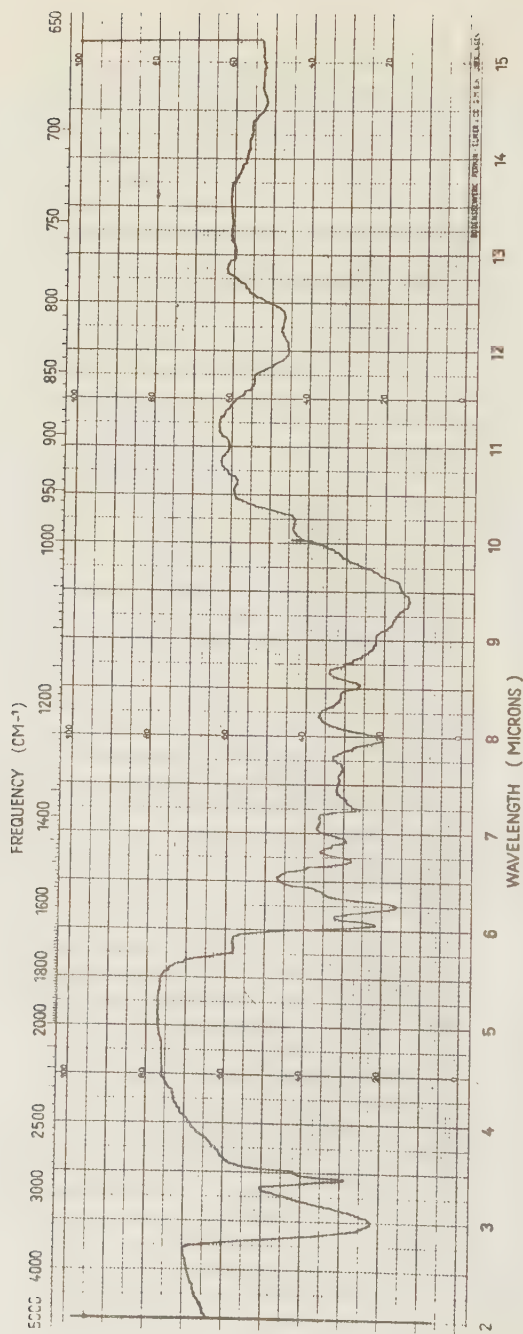


Abb. 13 IR-Spektrum des Flavonglykosides F₃ in KBr

3.4.3 Identifizierung des Flavonglykosides F₄

Aus der Fraktion A wurde nach mehrmaligem Umkristallisieren aus n-Butanol-Wasser das Flavonglykosid F₄ erhalten. Die Verbindung begann bei 196°C unter Braunfärbung zu sintern, erweichte bei 201-206°C und ging zwischen 210 und 229°C in eine viskose Schmelze über.

3.4.3.1 Tauböck-Test, Zirkon-Zitronensäure-Test (64,65,66,67,68)

Die Ergebnisse beider Reaktionen deuteten auf eine freie OH-Gruppe am C5 hin. Analog den Flavonverbindungen F₂ und F₃ zeigte die ätherische Lösung des F₄-Bor-Oxalat-Komplexes unter UV-Licht eine gelbe Fluoreszenz. Bei dem Zirkon-Zitronensäure-Test wurde die durch Zirkonium-

Ionen hervorgerufenen Farbvertiefung durch Zitronensäure aufgehoben.

3.4.3.2

Pc Verhalten der Flavonverbindung F₄

Das pc Verhalten der Flavonverbindung F₄ wurde in den Fließmittelsystemen Fl_{pc}¹, Fl_{pc}² und Fl_{pc}³ untersucht. Als Detektionsmittel fanden die bei F₂ und F₃ beschriebenen Reagenzien Verwendung.

Eine Zusammenstellung der Farbreaktionen auf dem PC wird in Tabelle 8 gegeben.

Für F₄ wurden folgenden Rf-Werte ermittelt:

Fl_{pc}¹ : 0,37

Fl_{pc}² : 0,62

Fl_{pc}³ : 0,44

Tabelle 8: Farbreaktionen der Flavonverbindung F_4 auf dem PC unter Verwendung verschiedener Sprühreagenzien.

	unbe- sprüht	NH_3	$AlCl_3$	$Pb(ac)_2$	$ZrOCl_2$	$ZrOCl_2$ +Zitron- ensäure
Tages- licht	(-) g	g	g	g	g	(-) g
UV-Licht	rb	gg	lg	bg	lg	rb

Abkürzungen: rb = rotbraun (+) = stark
 g = gelb (-) = schwach
 lg = leuchtend gelb bg = braungelb
 gg = grüngelb

3.4.3.3 Hydrolyse des Flavonglykosides F_4

Durch Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure wurde das Flavonglykosid F_4 in Apigenin und die Zucker Glukose und Rhamnose gespalten.

Die Einwirkung von β -Glukosidase auf F_4 führte zur Abspaltung von Rutinose, was gleichzeitig die β -glykosidische Verknüpfung des Disaccharides über die Glukose mit dem Aglukon anzeigte.

3.4.3.3.1 Identifizierung der Zucker

Die Identifizierung der Zucker erfolgte pc in dem Fließmittelsystem n-Butanol-Pyridin-Wasser



Abb. 14

Pc Nachweis der Zucker

Fließmittel: n-Butanol-
Pyridin-Wasser (6:4:3);
aufsteigend.

- 1 = Glukose
- 2 = Hydrolysat
- 3 = Rhamnose
- 4 = Hydrolysat + Glukose
+ Rhamnose

Rhamnose

Glukose

Rutinose

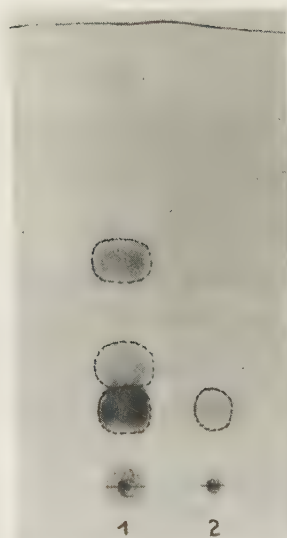


Abb. 15

Pc Nachweis der Rutinose

Fließmittel: n-Butanol-
Eisessig-Wasser (4:1:1);
aufsteigend

- 1 = Hydrolysat von Rutin
- 2 = Hydrolysat von F₄

(6:4:3) und n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1).

Die Zuckerspaltprodukte waren mit Glukose und Rhamnose bzw. Rutinose identisch (s.Abb. 14 und 15).

3.4.3.3.2

Identifizierung des Aglukons

Das Aglukon wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert und zeigte einen Schmelzpunkt von 346°C .

Im Mischschmelzpunkt mit reinem Apigenin erfolgte keine Depression.

Der Schmelzpunkt der Azetylverbindung lag entsprechend dem Apigenin-triazetat bei $185-186^{\circ}\text{C}$.

Pc konnte das Aglukon in den Fließmittelsystemen Fl_{pc}^4 und Fl_{pc}^5 durch den Vergleich mit authentischem Apigenin als solches identifiziert werden (s.Abb. 16).

Die Detektion erfolgte mit den unter 3.4.3.2 beschriebenen Sprühreagenzien. Im Zirkon-Zitronensäure-Test ergab sich kein Hinweis auf eine freie OH-Gruppe am C3; die gebildete Farbvertiefung wurde durch Zitronensäure ausgelöscht.

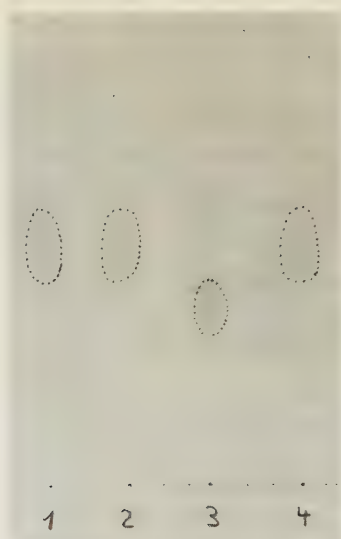


Abb. 16 Pc Identifizierung des Aglukons von F₄

Fließmittel: Fl_{pc}5; aufsteigend

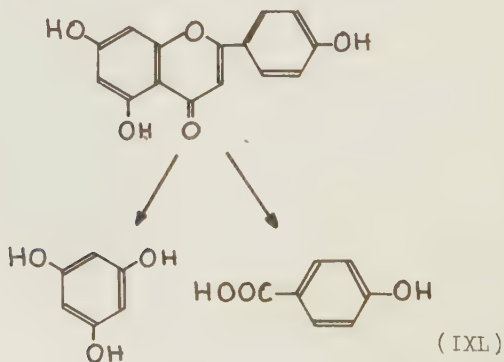
1 = Authentisches Apigenin

2 = Aglukon von F₄

3 = Authentisches Luteolin

4 = Aglukon von F₄ + auth. Apigenin

Als Spaltprodukte (76,77) des Alkaliabbaus wurden
de Phlorogluzin und p-Hydroxybenzoesäure nachge-
wiesen (IXL)(s.Abb. 17).



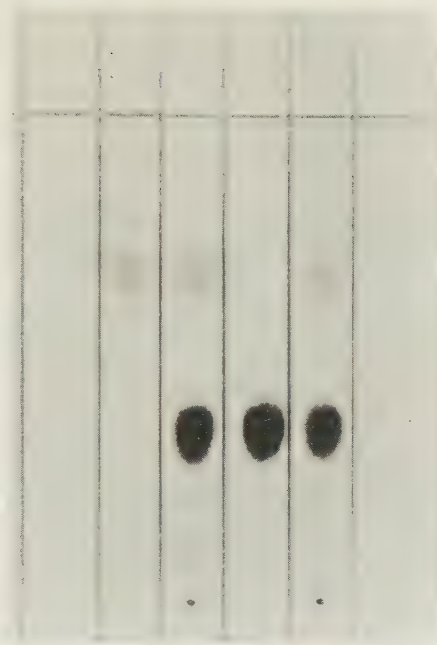


Abb. 17 Dc Identifizierung der Alkali-
Abbauprodukte

Fließmittel: Dioxan-Benzol-Eis-
essig (25:90:4)

- 1 = p-Hydroxybenzoesäure
- 2 = Alkali-Abbauprodukte
- 3 = Phlorogluzin
- 4 = Alkaliabbauprodukte + p-Hydroxy-
benzoesäure + Phlorogluzin.

Ein weiterer Beweis für die Identität des Aglukons mit Apigenin ergab sich aus dem Vergleich des IR-Spektrums des Aglukons mit dem einer Probe reinen Apigenins. Die Spektren stimmten in ihrem Verlauf überein und zeigten folgende kennzeichnenden Absorptionsbanden (s.Abb. 18):

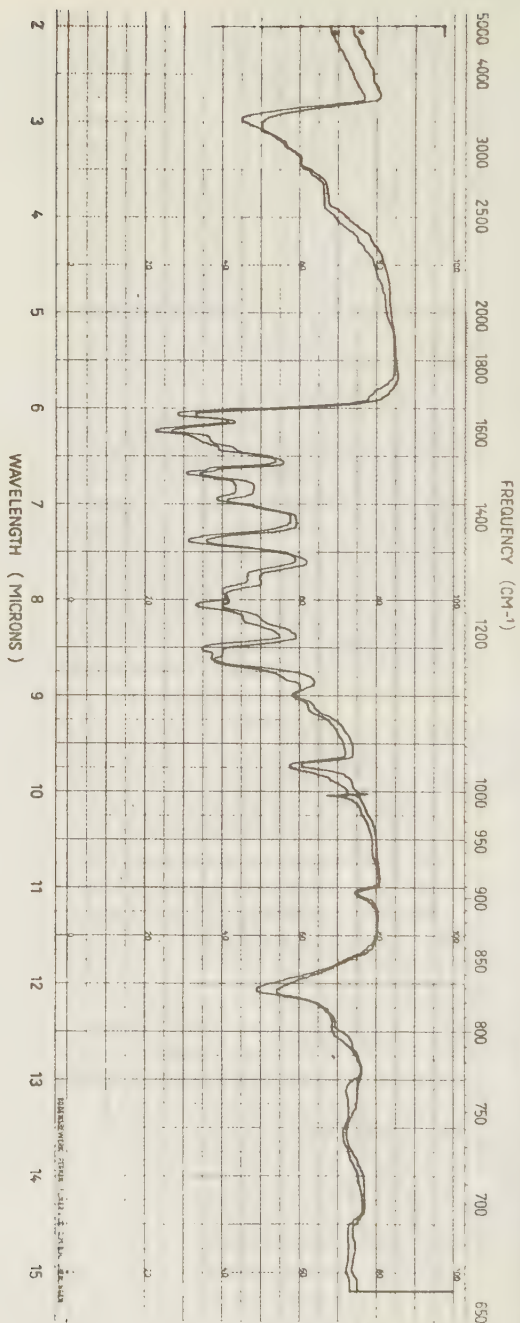


Abb. 18 IR-Spektren des Aglukons von $F_4(1)$ und einer Probe
authentischen Apigenins (2) in KBr.

1652 cm⁻¹ : C=O Valenzschwingung der Carbonylgruppe des heterocyclischen Ringes C.

832 cm⁻¹ : -CH Waggingschwingung des Ringes B.

Das Auftreten einer starken Bande im Bereich von 800 cm⁻¹ bis 860 cm⁻¹ deutet auf einen 1,4-substituierten Benzolring hin. (Seitenphenylrest)

3.4.3.4

Stellung der Zucker

Eine Glykosidierung des Apigenins in C5 und C4' Stellung wurde durch den Tauböck-Test, den Zirkon-Zitronensäure-Test (s.3.4.3.1) und die Eisen-III-chlorid-Reaktion (Braunfärbung bei Apigeninglykosiden mit einer freien OH-Gruppe am C5 (110,111)) ausgeschlossen. Gegen eine Glykosidierung am C4' sprach das Verhalten des Glykosides im Reduktionstest mit Magnesium und Salzsäure. Die alkoholische Lösung des Reduktionsproduktes zeigte beim Puffern mit Natriumazetat einen Farbumschlag von schwach rot nach violett, was für eine freie OH-Gruppe am C4' beweisend war.

Somit mußte die Glykosidbildung am C7 erfolgt sein. Diese Annahme fand ihre Bestätigung im negativen Ausfall der Reaktion des Glykosides mit Echtblau-

salz BB. Hierbei reagierte nur das Aglukon mit dem Diazoniumsalz unter Farbstoffbildung (80,81).

3.4.3.5 UV-Spektrophotometrische Untersuchungen (95,96,97)

Als zusätzlicher Beweis der Glykosidierung am C7 konnte der Vergleich der UV-Spektren des Glykosides und des Aglukons in reinem Äthanol und in Gegenwart von Natriumazetat angesehen werden. Eine bathochrome Verschiebung erfuhr nur das Maximum von Bande II des Aglukons (s.Abb. 19, Tabelle 9). Die im längerwelligen UV liegende Bande I des Glykosides zeigte in Gegenwart von Natriumazetat die Ausbildung eines zweiten Maximums. Diese Beobachtung deckt sich mit den Angaben von J u r d (91) über den Verlauf des UV-Spektrums von Apigenin-7-rhamnoglukosid bei Anwesenheit von Natriumazetat (s.Abb. 19, Tabelle 9).

Das Fehlen einer ortho-Dihydroxy-Gruppierung im Seitenphenyl konnte auch daraus abgeleitet werden, daß Bande I von F_4 in Gegenwart von Borsäure und Natriumazetat nur eine geringe Verschiebung von $3 \text{ m}\mu$ aufwies (s.Abb. 20, Tabelle 9).

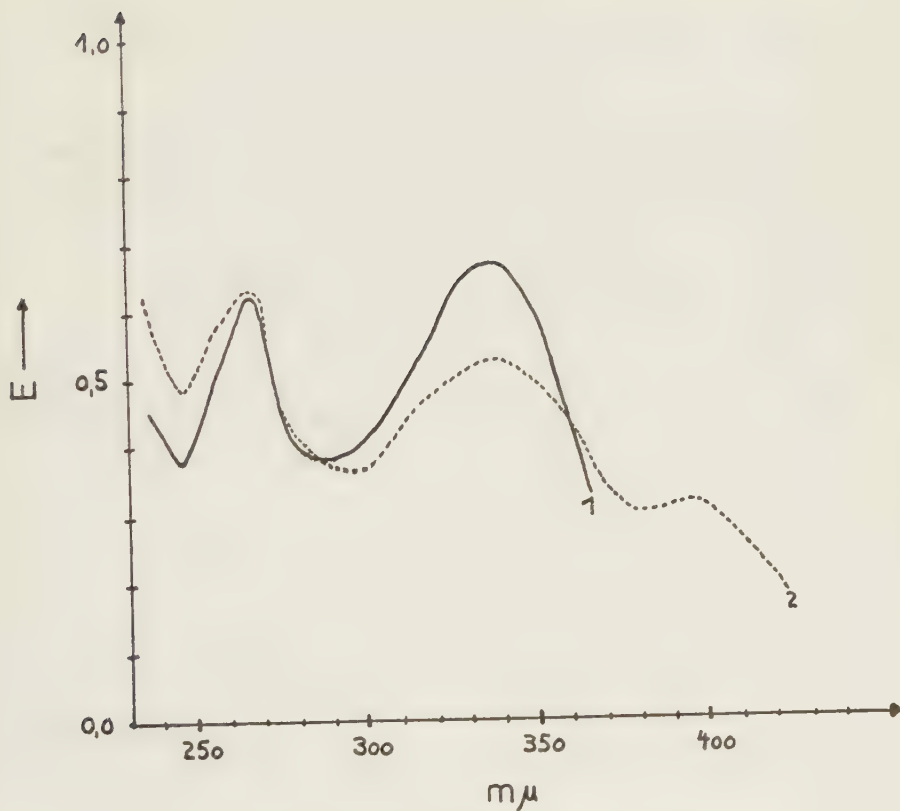


Abb. 19 UV-Absorptionsspektren des Flavon-
glykosides F_4

- 1 = Flavonglykosid F_4 in Äthanol
2 = Flavonglykosid F_4 in Äthanol
in Gegenwart von Natriumazetat

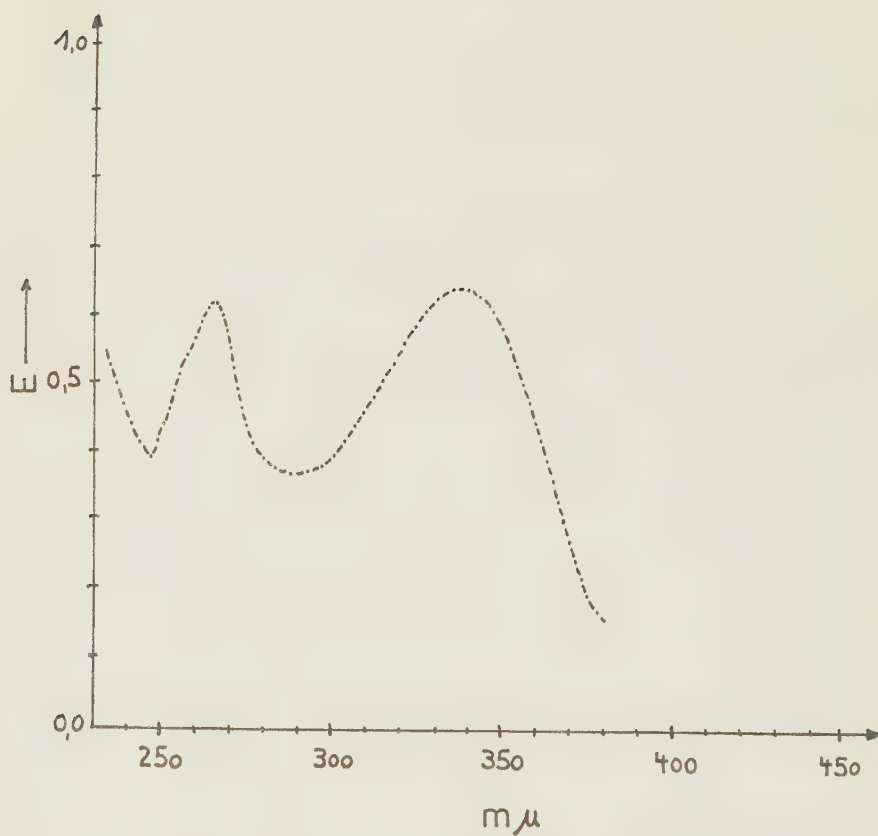


Abb. 20 UV-Absorptionsspektrum des Flavon-
glykosides F₄ in Äthanol in Gegenwart
von Borsäure und Natriumazetat.

Tabelle 9: UV-Absorptionsmaxima des Flavonglykosides F₄
und des dazugehörigen Aglukons

Verbindung	Äthanol		Äthanol + Na-azetat				Äthanol+Borsäure + Na-azetat			
	m/μ	m/μ	m/μ	m/μ	Δ m/μ	Δ m/μ	m/μ	m/μ	Δ m/μ	Δ m/μ
F ₄	336	267	337 398	265	+1	-2	338	265	+2	-2
Aglukon (Apigenin)	336	269	379	278	+43	+9	337	268	+1	-1

Nach den vorstehenden Ausführungen war dem Flavon-
glykosid F₄ die Struktur eines Apigenin-7-rhamno-
glukosides zuzuordnen.

3.4.4 Identifizierung von F₁

Nach Einengen von Eluat I wurde F₁ aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Der Schmelzpunkt lag bei 324⁰C und zeigte mit authentischem Luteolin keine Depression.

Die Azetylverbindung schmolz bei 226⁰C (Der Schmelzpunkt des Luteolin-tetraazetates liegt bei 226⁰C).

3.4.4.1 Tauböck-Test, Zirkon-Zitronensäure-Test (64,65,66,67,68)

Das Verhalten von F₁ im Tauböck- und Zirkon-Zitronensäure-Test deutete auf eine freie OH-Gruppe am C5 hin. So zeigte die ätherische Lösung des F₁-Bor-Oxalsäure-Komplexes unter UV-Licht eine gelbe Fluoreszenz; die Farbvertiefung mit Zirkon-oxychlorid wurde durch Zitronensäure aufgehoben.

3.4.4.3 UV-Spektrophotometrische Untersuchungen(95,96,97).

Aufnahmen der UV-Spektren von F₁, einmal in reinem Alkohol, zum anderen in Gegenwart von Natriumazetat und Borsäure-Natriumazetat erbrachten Hinweise auf die Substitutionsverhältnisse des Moleküls. Eine bathochrome Verschiebung des Maximums von Bande II auf Zusatz von Natriumazetat zeigte eine freie OH-Gruppe am C7 an. Die Existenz einer freien ortho-Dihydroxy-Gruppierung im Seitenphenylrest konnte durch die bathochrome Verschiebung des Maximums von Bande I in borsäurehaltiger und mit Natriumazetat gepufferter alkoholischer Lösung bewiesen werden (s.Tabelle 11).

Tabelle 11: UV-Absorptionsmaxima der Flavonverbindung F₁

Verbindung	Äthanol		Äthanol+Na-azetat				Äthanol+Borsäure + Na-azetat			
	m/μ	m/μ	m/μ	m/μ	Δ m/μ	Δ m/μ	m/μ	m/μ	Δ m/μ	Δ m/μ
F ₁	350	255	386	265	+36	+10	375	258	+25	+3

3.4.4.4 Alkaliabbau von F₁ (76,77)

Der Alkaliabbau führte zu Phlorogluzin und Protocatechusäure, die beide pc identifiziert

wurden (XXXV).

Der ortho-Dihydroxy-Gruppierung im Seitenphenylrest war durch den Nachweis von Protocatechusäure die C3', C4'-Stellung und dem Gesamtmolekül die Struktur eines 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavons (Luteolin) zuzuordnen.

3.4.4.5 IR-Spektroskopische Untersuchungen von F₁

Ein weiterer Beweis für die Identität von F₁ mit Luteolin wurde durch den Vergleich der IR-Spektren von F₁ und reinem Luteolin in KBr gebracht. Beide Spektren stimmten in ihrem Verlauf überein und zeigten folgende kennzeichnenden Absorptionsbanden:

1653 cm⁻¹ : C=O Valenzschwingung der Carbonylgruppe des heterocyclischen Ringes C

860 cm⁻¹, 829 cm⁻¹ : -CH Waggingschwingungen des Ringes B.

(s. Abb. 21)

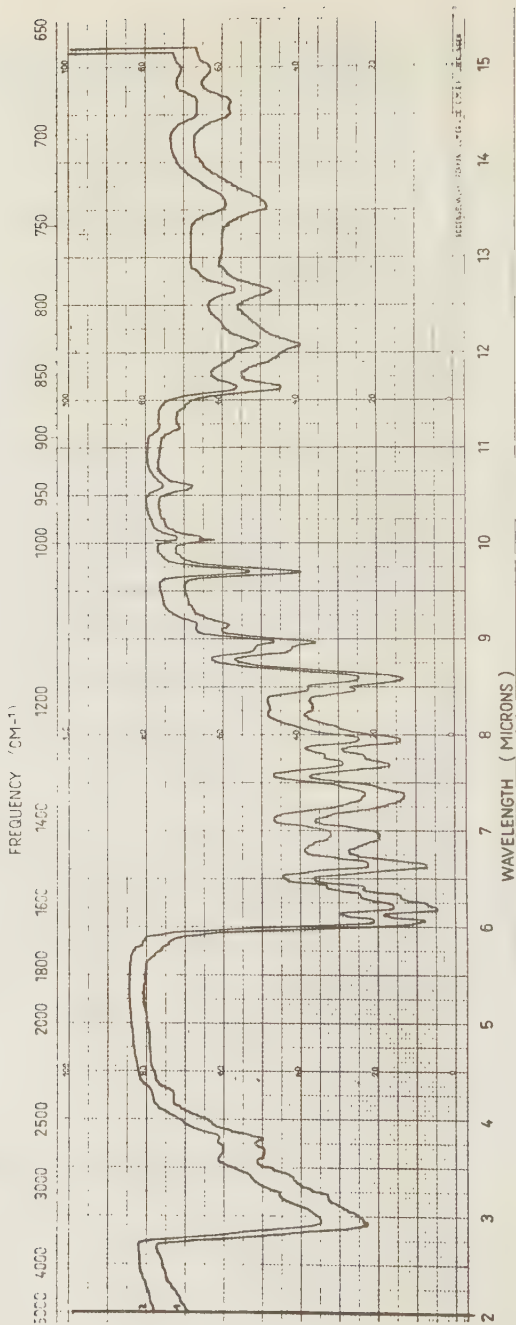


Abb. 21 IR-Spektren der Flavonverbindung F₁ und einer Probe
authentischen Luteolins in KBr.

3.5

Diskussion

Die isolierten 4 Flavonverbindungen sind mit Ausnahme von F_1 (Luteolin), Glykoside von Luteolin bzw. Apigenin. Auf Grund ihres spektralen Verhaltens gegenüber Natriumazetat und Borsäure-Natriumazetat und ihrer nicht vorhandenen Reaktionsfähigkeit gegenüber stabilen Diazoniumsalzen war den Verbindungen F_2 , F_3 und F_4 die Struktur eines 7-Glykosides zuzuordnen, was im Falle der Verbindung F_2 (Luteolin-7 β -glukosid) durch Methylierung und IR-Vergleich mit reinem Luteolin-7 β -glukosid und bei F_3 (Luteolin-7-rhamnoglukosid = rutinosid) durch partielle Hydrolyse und Methylierung erhärtet werden konnte. Die Flavonverbindung F_4 stellt das 7-Rhamno-glukosid des Apigenins dar und ist unter der Bezeichnung Rhoifolin bisher aus den Blättern von *Rhus succedanea* (110), von *Poncirus trifoliata* (112) und von *Boehmeria nipononivea* (113) isoliert worden. Flavonverbindung F_2 wurde aus *Digitalis purpurea* (114) isoliert und wird Glucoluteolin genannt. Die Isolierung eines Luteolin-7-rutinosides wurde in der Literatur bis jetzt nicht beschrieben.

Diesen Verbindungen kommt eine begrenzte spasmolytische Wirkung zu. So wurde von S o r m (115) und Mitarbeitern berichtet, daß Apigenin am isolierten

Intestinum papaverinartige, spasmolytische Wirkungen zeigt.

Neben dieser spasmolytischen Eigenschaft zeichnen sich die Flavone Apigenin und Luteolin, hauptsächlich jedoch ihre Glykoside, durch eine starke diuretische Wirkung aus (9,10,11).

Am insuffizienten Herzen können Luteolin und seine Derivate eine vorübergehende Besserung erzielen.

Somit ist es wahrscheinlich, daß den Flavonen in alkoholischen Auszügen der Früchte von *Daucus carota* therapeutische Wirkungen bei Stenocardien zukommen. Die Möglichkeit, daß die beobachtete Wirkung auf die Flavone allein zurückzuführen ist, wird auf Grund der geringen Konzentrationen, in denen die isolierten Flavone in der Droge vorliegen, - zusammen zu ca. 0,01% - angezweifelt. Vielmehr scheint es sich hierbei um eine Wirkung im Sinne eines Synergismus mit anderen pflanzlichen Inhaltsstoffen zu handeln.

4.	<u>Experimenteller Teil</u>	98
4.1	Isolierung der Flavonverbindungen	98
4.1.1	Extraktion	98
4.1.2	Anreicherung durch Ausschütteln mit Äther, Essigester, n-Butanol	99
4.1.3	Säulenchromatographie	100
4.1.3.1	Polyamid als Adsorbens	100
4.1.3.2	Zellulose als Adsorbens	100
4.2	Tauböck-Test	101
4.3	Zirkon-Zitronensäure-Test	102
4.4	Eisen-III-chlorid-Reaktion	102
4.5	Reduktionstest mit Magnesium und Salzsäure	102
4.5.1	Reaktion mit Natriumazetat	103
4.5.2	Reaktion mit Natriumkarbonat	103
4.5.3	Reaktion mit Eisen-III-chlorid	103
4.6	Hydrolyse	104
4.6.1	Hydrolyse mit Salzsäure	104
4.6.2	Hydrolyse mit β -Glukosidase	105
4.7	Untersuchungen des Hydrolysates	105
4.7.1	Glukosazon	105
4.7.2	PC der Zuckeranteile der Hydrolysate	106
4.7.3	Acetylierung	107
4.7.4	Alkaliabbauprodukte	108
4.8	PC der Flavonverbindungen	110
4.9	Reaktion mit stabilen Diazoniumsalzen	111
4.10	Methylierung der Flavonglykoside	112
4.11	Methylierung der Zucker	113
4.12	UV-Absorptionsspektren	115
4.13	IR-Absorptionsspektren	116

4. Experimenteller Teil

Allgemeine Vorbemerkungen:

Die in dieser Arbeit aufgeführten Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroheiztisch nach K o f f l e r ermittelt und sind unkorrigiert.

Die PC wurde mit Papier von S c h l e i c h e r und S c h ü l l 2043b Mgl durchgeführt.

Die isolierten Flavonverbindungen zeigten folgende Eigenschaften:

F₁ (Luteolin): Blaßgelbe Nadeln, in Methanol, Äthanol, Äther und Pyridin gut löslich, in Wasser sehr schwer löslich.

F₂ (Luteolin-7ß-glukosid): Blaßgelbe Nadeln, in Alkohol-Wasser-Gemischen und Pyridin gut löslich. Begrenzte Löslichkeit in Methanol, Äthanol.

F₃ (Luteolin-7-rhamnoglukosid): Kleine gelbe Nadeln, in Wasser und Pyridin gut löslich, in Methanol und Äthanol schwer, in Äther unlöslich.

F₄ (Apigenin-7-rhamnoglukosid): Kleine, fast farblose Nadeln, in Wasser und Pyridin gut löslich, in Methanol, Äthanol schwer und in Äther unlöslich.

4.1 Isolierung der Flavonverbindungen

4.1.1 Extraktion

Die in einer Drogenmühle fein zerkleinerten Früchte von *Daucus carota* wurden in Anteilen zu 500,0 g

72 h lang in einem Soxhletapparat mit Petroläther und Benzol extrahiert und anschließend je 60 h lang mit Methanol ausgezogen. Der nach dem Einengen des Methanolextraktes im Vakuum verbleibende Rückstand (zähe, braune Masse) wurde in 2 l Wasser aufgenommen (L_W).

4.1.2

Anreicherung der Flavonverbindungen durch Ausschütteln mit Äther, Essigester, n-Butanol

Zur Anreicherung der Flavonverbindung F_1 wurde L_W achtmal mit je 500,0 ml Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung zur Trockne eingengt. Es resultierte ein Rückstand von ca. 0,5 g.

Die Anreicherung der Flavonverbindung F_2 in Essigester erfolgte durch 15maliges Ausschütteln von L_W mit je 500,0 ml Essigester ($L_{E-est.}$)

Verbindungen F_3 und F_4 wurden durch anschließendes 12faches Ausschütteln mit 500,0 ml n-Butanol, das mit Wasser gesättigt war, angereichert ($L_{n-But.}$)

Das Einengen von ($L_{E-est.}$) und $L_{n-But.}$ führte zu einem gelbbraunen, pulvrigen Rückstand:

$$L_{E-est.} = 7,4 \text{ g}$$

$$L_{n-But.} = 9,8 \text{ g}$$

4.1.3 Säulenchromatographie

4.1.3.1 Polyamid als Adsorbens

Als Polyamid für die Säulenchromatographie fand Ultramidpulver^{*)} Verwendung.

Ausführung:

Säule: 5 cm
100 cm lang, mit eingearbeiteter Sinterplatte (G4)

Das Polyamid wurde mit Wasser angeschlemmt und unter Rühren in die Säule eingetragen. (Füllhöhe 90,0 cm). Monomere Anteile des Polyamids konnten durch mehrstündiges Waschen der Säule mit Wasser und Wasser-Methanol-Gemischen entfernt werden.

Die aufgegebene Substanzmenge betrug in der Regel 5,0 g. Mit ca. 10,0 l Wasser wurden die Verunreinigungen und anschließend mit ca. 3,5 l Methanol die Flavonverbindungen eluiert. Die Abtropfgeschwindigkeit betrug etwa 40 Tropfen/Minute.

4.1.3.2 Zellulose als Adsorbens

Die Säulenchromatographie an Zellulose wurde mit Zellulosepulver Nr. 125 von S c h l e i c h e r und S c h ü l l durchgeführt.

^{*)} Ultramid K228 BM₂, Handelsprodukt der BASF, Mannheim-Ludwigshafen.

Ausführung:

Säule : 5 cm

100 cm lang, mit eingearbeiteter Sinterplatte (G4).

Elutionsmittel: Essigsäure-n-Butanol-Wasser
(7 : 8 : 85)

Das Zellulosepulver wurde in dem Elutionsmittel angeschlemmt und unter Rühren in die Säule eingetragen (Füllhöhe = 90 cm). Durch Anlegen eines geringen Unterdruckes konnte eine gleichmäßige Packung der Säule erreicht werden.

Die aufgetragene Substanzmenge betrug zwischen 0,5 und 0,7 g.

Abtropfgeschwindigkeit: 10 Tropfen/Minute.

Die Wanderung der Flavonzonen wurde unter UV-Licht verfolgt und das Eluat in Einheiten von je 20,0 ml fraktioniert aufgefangen.

Pc Untersuchungen der einzelnen Fraktionen auf Einheitlichkeit erfolgten in dem Fließmittelsystem Fl_{pc}^1 .

4.2

Tauböck - Test

15 mg der entsprechenden Flavonverbindung wurden in 2,0 ml siedendem Eisessig gelöst und mit einer siedenden Lösung von 15 mg Oxalsäure und 15 mg Borsäure in 2,0 ml Eisessig vereinigt. Nach Ab-

kühlen der Reaktionslösung kam es zum Ausfallen des Bor-Oxalsäure-Flavonkomplexes, der in Äther gelöst wurde.

4.3 Zirkon-Zitronensäure-Test

Ca. 1,0 mg der Flavonverbindung wurden in 10,0 ml Methanol gelöst und mit je 2,0 ml einer 2%igen methanolischen Lösung von ZrOCl_2 und Zitronensäure versetzt. Mit Wasser wurde die Reaktionslösung auf ein Endvolumen von 50,0 ml gebracht.

Zur Ausführung des Zirkon-Zitronensäure-Tests auf dem PC wurde dieses mit einer Lösung von 2,0 g ZrOCl_2 in 100,0 ml Methanol und einer wässrigen 5% Zitronensäurelösung besprüht.

4.4 Reaktion mit Eisen-III-chlorid auf eine freie OH-Gruppe am C₅

Eine Lösung von 1,0 mg der Flavonverbindung in 10,0 ml Methanol wurde mit 3 Tropfen einer 1%igen methanolischen Eisen-III-chloridlösung versetzt.

4.5 Reduktionstest mit Magnesium und Salzsäure

In einem verschließbaren Reagenzglas wurde unter Eiskühlung 3,0 ml einer ca. 10^{-3}M äthanolischen Flavonlösung, der 50 mg Magnesiumpulver zugesetzt

waren, in Anteilen von 0,1 ml verdünnte Salzsäure zugetropft, insgesamt 0,5 ml. Die Salzsäurezugabe erfolgte in Abständen von 5 Minuten. Nach jeder Zugabe wurde das Gefäß verschlossen.

4.5.1 Reaktion mit Natriumazetat

1,0 ml der äthanolischen Lösung des Flavonreduktionsproduktes wurde mit einer kleinen Menge einer gesättigten Natriumazetatlösung versetzt.

4.5.2 Reaktion mit Natriumkarbonat

1,0 ml der äthanolischen Lösung des Reduktionsproduktes wurde mit einigen Tropfen einer gesättigten Natriumkarbonatlösung versetzt.

4.5.3 Reaktion mit Eisen-III-Chlorid in der Lösung des Reduktionsproduktes

1,0 ml der Lösung des Reduktionsproduktes wurden mit dem gleichen Volumen an Amylalkohol versetzt und diese Lösung bis zur schwach sauren Reaktion mit Wasser gewaschen. Der so vorbehandelten Lösung wurden 2 Tropfen einer 1%igen alkoholischen Eisen-III-chloridlösung zugegeben.

4.6 Hydrolyse

4.6.1 Hydrolyse mit Salzsäure

25 mg der Flavonverbindungen F_2 , F_3 , F_4 wurden in 10,0 ml 12,5%iger Salzsäure gelöst und ca. 4-5 h lang am Rückflußkühler im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Beendigung der Hydrolyse - der Verlauf wurde pc in dem Fließmittelsystem Fl_{pc}^1 verfolgt - wurde mit dem gleichen Volumen an Wasser verdünnt. Die ausgefallenen Aglukone wurden auf einem Mikroglasfiltertiegel gesammelt.

Aglukonanteil in % :

F_2 = 63,83 % (berechnet) 63,12% (gefunden)

F_3 = 48,14 % (berechnet) 47,90% (gefunden)

F_4 = 50,17 % (berechnet) 50,04% (gefunden)

Zur partiellen Hydrolyse von F_3 wurden 10 mg des Glykosides mit 12,5%iger Salzsäure 5 Minuten lang im siedenden Wasserbad erhitzt und das gebildete Luteolin-7ß-glukosid mit Essigester ausgeschüttelt.

Für das Flavonglykosid, das bei der partiellen Hydrolyse von F_3 anfiel, ergaben sich in den Fließmittelsystemen Fl_{pc}^1 , Fl_{pc}^2 und Fl_{pc}^3 die folgenden R_f -Werte, die in Tabelle 12 zusammengestellt und mit denen von authentischem Luteolin-7ß-glukosid verglichen wurden.

Tabelle 12: Rf-Werte des bei der partiellen
Hydrolyse von F₃ angefallenen Flavon-
glykosides in verschiedenen Fließmitteln.

	R f - W e r t e	
Fließ- mittel	Flavon- glykosid	Authent. Luteolin- 7B-glukosid
FL _{pc} ¹	0,12	0,12
Fl _{pc} ²	0,56	0,56
Fl _{pc} ³	0,39	0,39

4.6.2 Hydrolyse mit β -Glukosidase

5,0 mg der Flavonverbindung F₂, F₃ und F₄ wurden in 10,0 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von β -Glukosidase^{*)} bei 36°C im Brutschrank 12 h lang belassen. Das ausgefallene Aglukon wurde abgenutscht.

4.7 Untersuchung des Hydrolysates

4.7.1 Glukosazon

Das mit frisch gefälltem Silberkarbonat neutralisierte Hydrolysat von F₂ wurde auf ca. 1,0 ml eingengt und mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 1,0 g

*) β -Glukosidase, reinst. 400 E/mg der Firma
S e r v a Entwicklungslaboratorium, Heidelberg.

Phenylhydrazinhydrochlorid und 1,5 g Natriumazetat in 10,0 ml Wasser versetzt. Nach einstündigem Erhitzen auf dem Wasserbad bildete sich ein Niederschlag, der abzentrifugiert und aus einer Alkohol-Wasser-Mischung bis zur Schmelzpunktreinheit umkristallisiert wurde.

Die Darstellung des authentischen Glukosazons verlief auf die gleiche Weise. (Schmelzpunkte s.3.4.1.4.1)

4.7.2

PC der Zuckeranteile der Hydrolysate

Die PC der Monosaccharide erfolgte in dem Fließmittelsystem n-Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3) und die des Disaccharides (Rutinose) in dem Fließmittelsystem n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1), aufsteigend. Als Sprühmittel fand Anilinphthalat^{*)} Verwendung.

In Tabelle 13 wird eine Aufstellung der ermittelten Rf-Werte der Zucker gegeben.

^{*)} Die Zusammensetzung des Sprühmittels findet sich in dem Buch "Chromatographie" E.Merck (1959)

Tabelle 13: Rf-Werte der Zucker im Vergleich mit authentischer Glukose, Rhamnose und Rutinose*)

Fließ- mittel	Rf- W e r t e								
	HCl Hydroly- sat			Enzym Hydroly- sat			Authentische		
	F ₂	F ₃	F ₄	F ₂	F ₃	F ₄	Glukose	Rhamnose	Rutinose
n-Butanol-Eis- essig- Wasser (4:1:1)	--	--	--	--	0,19	0,19	--	--	0,19
n-Butanol-Pyri- din-Was- ser (6:4:3)	0,35	0,35 0,55	0,35 0,55	0,35	--	--	0,35	0,55	--

4.7.3

Azetylierung der Aglukone und der Verbindung F₁

Ca. 15-20 mg der entsprechenden Flavonverbindung wurden mit 3,0 ml frisch destilliertem Essigsäureanhydrid und 0,5 g wasserfreiem Natriumazetat 90 Minuten lang am Rückflußkühler im Sieden gehalten. Das Reaktionsprodukt wurde dann in 20,0 ml Eiswasser gegossen. Der farblose Niederschlag des gebildeten Luteolin-tetraazetates bzw. des Apigenin-triazetates konnte durch Umkristallisieren aus 70%igem

*) Rutinose wurde neben Glukose und Rhamnose nach 4 stündiger Hydrolyse von 30 mg Rutin in 10%iger Essigsäure (siedendes Wasserbad) im Hydrolysat erhalten.

Äthanol schmelzpunktrein erhalten werden.

Schmelzpunkte der Azetylprodukte:

F ₁	: 226°C
Aglukon von F ₂	: 225 - 226°C
Aglukon von F ₃	: 225°C
Aglukon von F ₄	: 185 - 186°C
Tetraazetyluteolin	: 225°C (Lit)
Tetraazetylapienin	: 185-186°C (Lit)

4.7.4

Alkaliabbauprodukte der Aglukone und der Flavon-
verbindung F₁

Ca. 8-10 mg der Flavonverbindungen wurden in einem Porzellantiegel mit 1,0 g KOH (Rotuli) geschmolzen. Die Temperatur der Schmelze betrug 200°C und wurde für weitere 2-3 Minuten beibehalten. Nach Erkalten wurde der Schmelzkuchen mit 20,0 ml Wasser ausge-
läugt. Aus dieser wässrigen Lösung konnten nach dem Ansäuern mit Salzsäure die Abbauprodukte durch 4-5maliges Ausschütteln mit je 15,0 ml Äther extra-
hiert werden. Die vereinigten Ätherauszüge wurden über Natriumsulfat getrocknet und auf ein Volumen von 3,0-4,0 ml eingengt.

Die Identifizierung der Abbauprodukte von F₁ und derjenigen der Aglukone von F₂ und F₃ erfolgte pc

in dem Fließmittelsystem Fl_{pc}^3 , aufsteigend. Als Sprühreagenz fand eine 5%ige wässrige Echtblausalz BB-Lösung Verwendung. Das PC wurde mit einer 5%igen wässrigen NaOH-Lösung nachbesprüht.

Folgende Rf-Werte wurden für die Abbauprodukte ermittelt (s.Tabelle 14):

Tabelle 14: Rf-Werte und Farbreaktionen der Abbauprodukte und je einer authentischen Probe Phlorogluzin und Protocatechusäure in Fl_{pc}^3 mit Echtblausalz BB-Lösung als Sprühreagenz

	Alkaliabbauprodukte		Authentische Proben	
	I	II	Phlorogluzin	Protocatechusäure
Rf-Werte	0,70	0,81	0,70	0,81
Farbe	tiefblau	rotbraun	tiefblau	rotbraun

Die Identifizierung der Abbauprodukte des Aglukons von F_4 erfolgte dc in dem Fließmittelsystem Dioxan-Benzol-Eisessig (25:90:4). Als Adsorptionsmittel wurde Kieselgel G "Merck", das mit einem Streichgerät (Desaga) in einer Schichtdicke von ca. 0,25 mm aufgetragen wurde, verwandt. Die Laufstrecke betrug 10,0 cm; als Sprühreagenz diente eine 0,5%ige wässrige Echtblausalz BB-Lösung. Das DC wurde mit einer 5%igen wässrigen NaOH-Lösung nachbehandelt (s.Tabelle 15).

Tabelle 15: Rf-Werte und Farbreaktionen des Abbauproduktes des Aglukons von F₄ in dem Fließmittel Dioxan-Benzol-Eisessig (25:90:4) mit Echtblausalz BB-Lösung als Sprühreagenz.

	Alkaliabbauprodukte		Authentische Proben	
	I	II	Phlorogluzin	Hydroxybenzoesäure
Rf-Werte	0,34	0,55	0,34	0,55
Farbe	tiefblau	braun	tiefblau	braun

4.8 PC der Flavonverbindungen

Die PC der Flavonglykoside wurde in den unter 3.4.1.3, Tabelle 3, beschriebenen Fließmittelsystemen Fl_{pc}¹, Fl_{pc}² und Fl_{pc}³ aufsteigend durchgeführt. Eine Zusammenstellung der ermittelten Rf-Werte findet sich in Tabelle 2.

Zur PC der Flavonaglukone und der Flavonverbindung F₁ wurden die Fließmittelsysteme Fl_{pc}⁴, Fl_{pc}⁵ und Fl_{pc}⁶ herangezogen (s. 3.4.1.3, Tabelle 3). Eine Zusammenstellung der Rf-Werte wird in Tabelle 16 gegeben.

Tabelle 16: Rf-Werte der Flavonaglukone und der Flavonverbindung F₁ in verschiedenen Fließmitteln.

Fließmittel	Rf - W e r t e					
	A g l u k o n v o n			F ₁	Authentisches	
	F ₂	F ₃	F ₄		Luteolin	Apigenin
Fl _{pc} ⁴	0,65	0,65	0,84	0,65	0,65	0,84
Fl _{pc} ⁵	0,27	0,27	0,34	0,27	0,27	0,34
Fl _{pc} ⁶	0,61	0,61	0,89	0,61	0,61	0,89

Die in dieser Arbeit als Detektionsmittel für die Flavonverbindungen gebrauchten Sprühmittel sind in Tabelle 4 (3.4.1.3) zusammengestellt*).

4.9. Reaktion der Flavonverbindungen mit stabilen Diazoniumsalzen

Das PC wurde mit einer 0,5%igen wässrigen Lösung von Echtblausalz BB und anschließend mit 5%iger Natronlauge besprüht. Im Falle der Flavonaglukone

*) Die Zusammensetzung der verwendeten Sprühreagenzien findet sich in dem Buch "Chromatographie" E. Merck (1959).

und der Flavonverbindung F₁ erfolgte Bildung eines rötlich violetten Farbstoffes.

4.10 Methylierung der Flavonglykoside

Ca. 30 mg der Flavonglykoside F₂ und F₃ wurden in je 150,0 frisch destilliertem und getrocknetem Azeton gelöst und dieser Lösung 3,0 getrocknetes Kaliumkarbonat und 2,5 ml Dimethylsulfat hinzugesetzt. Diese Mischung wurde unter ständigem Rühren (Magnetrührer) 30 h lang auf dem Wasserbad in gelindem Sieden gehalten. Nach Zusatz von 30,0 ml kaltem Wasser wurde das Azeton abdestilliert. Hierbei kam es zur Bildung eines rötlichbraunen Niederschlages, der abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in wenig Methanol gelöst wurde. Diese Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure auf einen Salzsäuregehalt von 12,5% eingestellt und anschließend 4 h lang im siedenden Wasserbad hydrolysiert.

Das ausgefallene Aglukon wurde abfiltriert, in Methanol gelöst und pc mit dem entsprechenden Trimethoxyluteolin, das aus authentischem Luteolin-7ß-glukosid in gleicher Weise dargestellt wurde, verglichen.

Die PC erfolgte in dem Fließmittelsystem Fl_{pc} 7. Die Spaltprodukte der methylierten Glykoside zeigten Rf-Werte, die in Tabelle 17 zusammengestellt sind.

Tabelle 17: Rf-Werte der methylierten Spaltprodukte der Flavonglykoside F₂ und F₃ in Fl_{pc}⁷

Fließ- mittel	Rf - W e r t e		
	Methylierte Spaltprodukte von		
	F ₂	F ₃	authent. Luteolin-7ß-glukosid
Fl _{pc} ⁷	0,34	0,34	0,34

Die Methoxyderivate zeigten auf dem PC unter UV-Licht lila Fluoreszenz, die beim Begasen mit Ammoniak in eine gelbliche Fluoreszenz überging.

4.11

Methylierung der Zucker

In eine Lösung von 25 mg des Flavonglykosides F₃ in 2,0 ml Dimethylformamid wurden nach Zugabe von 100 mg Methyljodid unter ständigem Umrühren 0,1 g Silberoxid eingetragen. Nach 12stündigem Rühren der Mischung bei Zimmertemperatur erfolgte Abtrennung der unlöslichen Salze. Diese wurden mit Dimethylformamid gewaschen und die Filtrate im Vakuum bei 100°C eingeeengt. Der Rückstand konnte mit 15,0 ml Chloroform aufgenommen werden. Nach

dem Waschen der Chloroformlösung mit Wasser und dem Vertreiben des Chloroforms resultierte ein sirupöser, braun gefärbter Rückstand, der in 15,0 ml methanolischer Salzsäure (12,5%) 6 h lang im siedenden Wasserbad hydrolysiert wurde. Durch Ausschütteln mit Äther ließ sich das methylierte Aglukon entfernen. Nach dem Einengen der Alkohol-Wasser-Phase im Vakuum konnte der von Salzsäure befreite Rückstand der Methylzucker in Chloroform aufgenommen werden.

Bei der Darstellung des Gemisches von 2,3,4-Trimethyl-O-glukose und 2,3,4-Trimethyl-O-rhamnose aus 50 mg Rutin wurde analog verfahren.

Die Gewinnung von 2,3,4-Trimethyl-O-rhamnose erfolgte auch durch Permethylierung von 1-Monomethyl-O-rhamnose und anschließender Methanolyse in oben beschriebener Weise.

Die Trennung der Methylzucker konnte pc in dem Fließmittelsystem Diisopropyläther mit Dimethylsulfoxid gesättigt auf mit Dimethylsulfoxid imprägniertem Papier erzielt werden. Die Imprägnierung der Papierbögen erfolgte durch Tränken dieser mit einer Mischung von 1 Teil Dimethylsulfoxid in 5 Teilen Toluol. Die so vorbehandelten Papiere wurden kurz zwischen Filtrierpapier abgepreßt, anschließend bei 60°C getrocknet; dieser Vorgang der Imprägnierung wurde 2 mal wiederholt.

Die Chromatographie der Methylzucker verlief absteigend und erstreckte sich über einen Zeitraum von 46 h (Durchlaufchromatogramm). Als Sprühreagenz fand Anilinphthalat Verwendung.

4.12

UV-Absorptionsspektren

Die Aufnahme der UV-Absorptionsspektren erfolgte in absolutem Äthanol. Es wurden Stammlösungen der einzelnen Flavonverbindungen in einer Konzentration von ca. 10^{-4} m hergestellt, die wie folgt verdünnt wurden:

- 1) Aufnahme der UV-Spektren in absolutem Äthanol ohne Zusatz von Natriumazetat bzw. Natriumazetat und Borsäure:
2,0 ml der Stammlösung wurden mit absolutem Äthanol auf 10,0 ml verdünnt und die Spektren zwischen 380 m/ μ und 220 m/ μ aufgenommen.
- 2) Aufnahme der UV-Spektren in reinem Äthanol in Gegenwart von frisch geschmolzenem Natriumazetat:
2,0 ml der Stammlösung wurden analog 1) mit absolutem Äthanol auf 10,0 ml verdünnt, anschließend erfolgte Zusatz von frisch geschmolzenem Natriumazetat zur Lösung im Überschuß. Nach Ablauf von 20 Minuten wurden die Spektren zwischen 460 m/ μ und 220 m/ μ aufgenommen.
- 3) Aufnahme der UV-Spektren in reinem Äthanol in Gegenwart von Borsäure und Natriumazetat:
2,0 ml der Stammlösung wurden mit 2,0 ml einer gesättigten Borsäurelösung in absolutem Äthanol

versetzt; diese Mischung wurde mit Äthanol auf 10,0 ml aufgefüllt. Dieser so verdünnten Lösung wurde frisch geschmolzenes Natriumazetat im Überschuß zugesetzt.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte nach 20 Minuten zwischen 400 m/ μ und 220 m/ μ .

Alle Messungen erfolgten im Beckman - Spektrophotometer DB in 10 mm Küvetten mit Hilfe eines automatischen Schreibers.

4.13 IR-Absorptionsspektren

Die IR-Absorptionsspektren der Flavonverbindungen wurden in KBr (Konzentration: 400-700 γ auf 300 mg KBr) in dem Spektralphotometer 221 mit NaCl-Prisma, Bodenseewerk Perkin Elmer, aufgenommen.

Der Prof. Dr. med. M u c h A.G. in Bad Soden-Taunus danke ich für die Unterstützung und die Überlassung von Drogenmaterial.

5. Zusammenfassung

Nach dem Entfernen der lipophilen Begleitstoffe mit Petroläther und Benzol wurden die Flavonverbindungen der Früchte von *Daucus carota* mit Methanol extrahiert. Diese konnten durch fraktionierte Ausschüttelung mit Äther, Essigester und n-Butanol und anschließender Säulenchromatographie an Polyamid und Zellulose rein dargestellt werden.

Die isolierten Verbindungen wurden identifiziert als:

- F₁ : Luteolin
- F₂ : Luteolin-7B-glukosid
- F₃ : Luteolin-7-rhamnoglukosid
- F₄ : Apigenin-7-rhamnoglukosid

Ihre Identifizierung erfolgte durch verschiedene Farbreaktionen (Tauböck-Test, Zirkon-Zitronensäure-Test, Eisen-III-chlorid-Reaktion, Reduktionstest), Abbaureaktionen mit Alkalihydroxyd, Aufnahme der UV- und IR-Spektren und vergleichende PC und DC. Die Stellung der Zucker konnte aus dem Verhalten der Flavonverbindungen gegenüber stabilen Diazoniumsalzen, den Verschiebungen der UV-Absorptionsmaxima in Gegenwart von Natriumazetat und Natriumazet-Borsäure und durch Methylierung mit nachfolgender Hydrolyse der betreffenden Flavonglykoside ermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- | | | |
|------|---|--|
| (1) | L. Armentano,
A. Bentsáth,
T. Béres,
St. Rusznyák,
A. Szent - Györgyi | Dtsch. med. Wschr.
<u>62</u> , 1325 (1936) |
| (2) | A.M. Ambrose,
F. de Eds | J. Pharmacol. exp. Therap.
<u>90</u> , 359 (1947) |
| (3) | L. Hepding | Dtsch. med. Wschr.
<u>74</u> , 1575 (1949) |
| (4) | A. Jeney,
A.G. Czimmer | Arch. exp. Path. Pharmacol.
<u>183</u> , 571 (1936) |
| (5) | M. Masrcré,
R. Paris | Bull. Sci. pharm.
<u>43</u> , 279 (1936) |
| (6) | E. Jeney | Zschr. inn. Med.
<u>28</u> , 165 (1947) |
| (7) | H. Bentz | Pharmazie
<u>6</u> , 598 (1951) |
| (8) | H.F. Henne | Klin. Wschr.
<u>31</u> , 522 (1953) |
| (9) | T. Fukuda | Arch. exp. Path. Pharmacol.
<u>164</u> , 685 (1932) |
| (10) | A. Clerc,
R. Paris | C. R. Soc. Biol.
<u>133</u> , 46 (1940) |

- (11) A. Clerc,
R. Paris C. R. Soc. Biol.
133, 49 (1940)
- (12) F. Sorm,
Z. Cekan,
H. Raskova Chem. Histy.
46, 308 (1952)
- (13) R. Paris,
J. Guéguen Ann. pharm. franc.
11, 421 (1953)
- (14) M.A. Anagarskaja,
J.I. Chadzaj,
D.G. Kolesnikov,
A.P. Prokopenko,
A.A. Dubinskiij,
N.L. Subov Klin. Med. Moskva
36, 29 (1958)
- (15) L. Hörhammer,
H. Wagner Arch. Pharm.
291, 44 (1958)
- (16) R. Kuhn,
I. Löw Naturwissenschaften
283 (1948)
- (17) Y. Kishimoto J. pharm. Soc. Japan
75, 1437 (1955)
J. pharm. Soc. Japan
76, 250 (1956)
- (18) S. von Kostanecki,
J. Tambor Ber.
32, 2260 (1899)
- (19) F.M. Dean Naturally Occuring Oxygen
Ring Compounds
Butterworths, London (1963)
p. 280
- (20) O.P. Mittal,
T.R. Seshadri J. chem. Soc.
2176 (1956)

- (21) S. Rangaswami,
J.V. Rao,
T.R. Seshadri
Proc. Indian Acad. Sci.
16 A, 319 (1942)
- (22) L.H. Briggs,
R.H. Locker
J. chem. Soc.
2157 (1949)
- (23) L.H. Briggs,
R.H. Locker
J. chem. Soc.
2376 (1950)
- (24) H.W. Evans,
A. McGookin,
L. Jurd,
A. Robertson,
W.R.N. Williamson
J. chem. Soc.
3510 (1957)
- (25) L. Hörhammer,
H. Wagner,
N. Nieschlag,
G. Wildt
Arch. Pharm.
292, 380 (1959)
- (26) T.A. Geissman,
Ch.T. Davis
J. Am. chem. Soc.
76, 3507 (1954)
- (27) C.D. Douglass,
Q.L. Morris,
S.H. Wender
J. Am. chem. Soc.
73, 4023 (1951)
- (28) V.B. Mahesh,
T.R. Seshadri
Proc. Indian Acad. Sci.
41 A, 210 (1955)
- (29) W.B. Whalley
Symposium on Vegetable
Tannins
Cambridge, April 1956, p.151
- (30) T.H. Simpson,
B.L. Shaw
J. chem. Soc.
655 (1954)

- (31) D.H.R. Barton,
R.C. Cookson,
W. Klyne,
C.W. Shopper,
Chem. a. Ind. (London)
21 (1954)
- (32) E.M. Philbin,
T.S. Wheeler
Proc. chem. Soc.
167 (1958)
- (33) R. Willstätter,
A.E. Everest,
Ann.
401, 189 (1913)
- (34) R. Robinson,
D.D. Pratt
J. chem. Soc.
1577 (1922)
- (35) G.G. Le Fèvre,
J. Pearson
J. chem. Soc.
37 (1934)
- (36) F.E. King,
W. Bottomley,
Chem. a. Ind. (London)
1368 (1953)
- (37) J.W. Clark-Lewis,
P.I. Mortimer
J. chem. Soc.
4106 (1960)
- (38) J.W. Clark-Lewis,
G.F. Katekar,
P.I. Mortimer
J. chem. Soc.
499 (1961)
- (39) F.E. King,
J.W. Clark-Lewis
Chem. a. Ind. (London)
757 (1954)
- (40) L. Bauer,
A.J. Birch,
W.E. Hillis
Chem. a. Ind.
433 (1954)
- (41) K. Freudenberg
Ber.
53, 1416 (1920)
- (42) K. Freudenberg,
E. Cohn
Ber.
56, 2127 (1923)

- (43) K. Freudenberg, Ber.
O. Böhme, 55, 1734 (1922)
L. Purrmann,
- (44) K. Freudenberg, Ann.
H. Fikentscher, 442, 309 (1925)
W. Wenner
- (45) F.E. King, J. chem. Soc.
J.W. Clark-Lewis, 2948 (1955)
W.F. Forbes
- (46) A.J. Birck, J. chem. Soc.
J.W. Clark-Lewis, 3586 (1957)
A. Robertson
- (47) R. Karrer, Helv. chim. Acta
F.M. Strong, 19, 25 (1936)
- (48) T.A. Geissman, J. Am. chem. Soc.
J.B. Harborne, 78, 825 (1956)
M.K. Seikel
- (49) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
H. Wagner, 291, 44 (1958)
H. Götz
- (50) C.G. Nordström, J. chem. Soc.
T. Swain, 2764 (1953)
- (51) C.G. Nordström, Arch. Biochem. Biophys.
T. Swain, 60, 329 (1956)
- (52) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
E. Vorndran, 289, 316 (1956)
H. Wagner

- (53) L. Hörhammer,
H. Wagner Arch. Pharm.
289, 532 (1956)
- (54) L. Hörhammer,
H. Wagner Arch. Pharm.
290, 224 (1957)
- (55) C.H. Ice,
S.H. Wender Anal. Chem.
24, 1616 (1952)
- (56) C.H. Ice,
S.H. Wender J. Am. chem. Soc.
75, 117 (1953)
- (57) W. Grassmann,
H. Hörmann,
K. Hartl Makromolekulare Chemie
21, 37 (1956)
- (58) H. Hörhammer,
G. Wagner,
W. Leeb Naturwissenschaften
44, 1 (1957)
- (59) L. Hörhammer,
H. Wagner Pharm. Ztg.
104, 783 (1959)
- (60) L. Hörhammer,
H. Wagner Dtsch. Apoth.-Ztg.
99, 1043 (1959)
- (61) E. Steinegger,
D. Sonanini Pharmazie
15, 643 (1960)
- (62) L. Hörhammer,
H. Wagner,
H. Schilcher Arzneimittelforschung
12, 1 (1962)
- (63) L. Hörhammer,
H. Wagner,
F. Gloggengießer Arch. Pharm.
291, 126 (1958)

- (64) C.W. Wilson J. Am. chem. Soc.
61, 2303 (1939)
- (65) K. Tauböck Naturwissenschaften
30, 439 (1942)
- (66) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
R. Hänsel 288, 315 (1955)
Arch. Pharm.
286, 447 (1953)
- (67) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
R. Hänsel 285, 438 (1952)
- (68) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
R. Hänsel 284, 276 (1951)
- (69) L. Jurd, J. Org. Chem.
T.A. Geissman 21, 1395 (1956)
- (70) J.B. Harborne J. Chromatogr.
2, 581 (1959)
- (71) E.C. Bate-Smith, Biochim. Biophys. Acta
R.G. Westall 4, 427 (1950)
- (72) T.B. Gage, Anal. Chem.
C.D. Douglass, 23, 1582 (1951)
S.H. Wender
- (73) H.W. Casteel, Anal. Chem.
S.H. Wender 25, 508 (1953)
- (74) T.H. Simpson J. chem. Soc.
L. Garden 4638 (1952)

- (75) L. Hörhammer,
K.H. Müller Arch. Pharm.
237, 310 (1954)
- (76) K. Venkataraman The Chemistry of Flavonoid
Compounds (T.A. Geissman)
Pergamon-Press (Oxford,
London, New York, Paris)
1962, p.83
- (77) K. Venkataraman Fortschr. d. Chemie org.
Naturstoffe
17, 1 (1959)
- (78) H. Henecka Chemie der β -Dicarbonyl-
verbindungen
Springer-Verlag (Berlin)
1950, p. 110
- (79) C.H. Briggs J. chem. Soc.
R.H. Locker 3131 (1951)
- (80) R. Neu Z. anal. Chem.
151, 321 (1956)
- (81) R. Neu Z. anal. Chem.
153, 183 (1956)
- (82) R. Willstätter,
H. Mallison S.B. preuß. Akad. Wiss.
phys.-math. Kl.
769 (1914)
- (83) Y. Asahina,
M. Inubuse Ber.
64, 1256 (1931)
- (84) T.A. Geissman,
R.O. Clinton J. Am. chem. Soc.
68, 700 (1946)
- (85) R. Mirza,
R. Robinson Nature
166, 997 (1950)
- (86) R. Willstätter Ber.
47, 2874 (1914)

- (87) H.G.C. King, J. chem. Soc.
T. White 3901, (1957)
- (88) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
K.H. Müller 287, 376 (1954)
- (89) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
R. Hänsel 287, 36 (1954)
- (90) W. Baker, J. chem. Soc.
R. Robinson 3117 (1928)
- (91) L. Hörhammer, Arch. Pharm.
H.J. Gehrman 292, 113 (1959)
- (92) B.L. Shaw, J. chem. Soc.
T.H. Simpson 5027 (1952)
- (93) J. Piccard, Ber.
10, 176 (1877)
- (94) S. von Kostanecki Ber.
26, 2901 (1893)
- (95) L. Jurd, Arch. Biochem. Biophys.
T.A. Geissman, 67, 284 (1957)
M.K. Seikel
- (96) L. Jurd, J. Org. Chem.
R.M. Horowitz 22, 1618 (1957)
- (97) L. Jurd Arch. Biochem. Biophys.
63, 376 (1956)
- (98) G.H. Mansfield Nature
T. Swaine, 172, 23 (1953)
C.G. Nordström

- (99) C.G. Nordström,
T. Swain J. chem. Soc.
2764 (1953)
- (100) T.A. Geissman Moderne Methoden der Pflanzen-
analyse (K. Peach, M.V. Tracey)
Springer-Verlag (Berlin)
1955, Bd. III, p.485
- (101) L. Jurd The Chemistry of Flavonoid
Compounds (T.A. Geissman)
Pergamon-Press (Oxford, London,
New York, Paris) 1962, p.108
- (102) T.H. Simpson,
J.L. Beton J. chem. Soc.
4065 (1954)
- (103) G.E. Inglett J. Org. Chem.
23, 95 (1958)
- (104) H.L. Hergerth,
E.F. Kurth J. Am. chem. Soc.
75, 1622 (1953)
- (105) J.W. Looker,
W.W. Hanneman J. Org. Chem.
27, 381 (1962)
- (106) L. Hörhammer,
H. Wagner Recent Progress in the
Chemistry of Natural and
Synthetic Colouring Matters
and Related Fields
(T.S. Gore, B.S. Joshi,
S.V. Sunthakar, B.D. Tilak)
Academic-Press (New York)
1962, p.318
- (107) R. Kuhn,
H. Trischamnn,
I. Löw Angew. Chem.
67, 32 (1955)

- (108) K. Wallenfels,
G. Bechtler,
R. Kuhn,
H. Trischmann,
H. Egge
Angew. Chem.
75, 1014 (1963)
- (109) B. Wickberg
Acta chem. Scand.
12, 615 (1958)
- (110) S. Hattory,
H. Matsuda
Arch. Biochem. Biophys.
37, 85 (1952)
- (111) S. Hattory,
M. Shimokoriyama,
M. Kanao
J. Am. chem. Soc.
74, 3614 (1952)
- (112) S. Hattory,
M. Shimokoriyama
Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.
27, 139 (1956)
- (113) T. Nakaoki,
N. Morita,
Y. Yoshida
J. Pharm. Soc. Japan
77, 112 (1957)
- (114) G. Hukuti
J. Pharm. Soc. Japan
56, 569 (1936)
- (115) F. Sorm,
Z. Cekan,
H. Raskova
Chem. histy.
46, 308 (1952)

Lebenslauf

Am 19. November 1933 wurde ich, Paul Edmund Raabe, als Sohn des Apothekers Heinrich Raabe und seiner Ehefrau Lucie Raabe, geb. Schuy, in Frankfurt am Main geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich bis Kriegsende das Kaiserin-Friedrich Gymnasium in Bad Homburg und war anschließend 8 1/2 Jahre bis zur Reifeprüfung im März 1954 Schüler der Muster-Schule - Städt. Realgymnasium für Jungen - in Frankfurt am Main. Es folgte eine zweijährige Praktikantenzeit in der Altstadt-Apotheke in Frankfurt am Main, die ich mit der pharmazeutischen Vorprüfung im März 1956 in Wiesbaden abschloß. Im Wintersemester 1956 begann ich das Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und legte im Sommer 1959 die pharmazeutische Prüfung ab. Nach einjähriger Tätigkeit in der Apothekenpraxis erhielt ich im Oktober 1960 die Approbation als Apotheker. Im November 1960 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Universität unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Janecke mit der Anfertigung meiner Dissertation. Seit Juni 1963 verwalte ich am gleichen Institut die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten.

Herrn Professor Dr. H. J a n e c k e , meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater, bin ich zu tiefem Dank verpflichtet für seine vielseitigen Anregungen und wertvolle Unterstützung, die er mir bei der Anfertigung dieser Arbeit gewährt hat.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. C. R o h - m a n n , danke ich ergebenst für die Aufnahme als Doktorand in seinem Institut und die Unterstützung, die er mir zukommen ließ.

Dem neuen Direktor unseres Institutes, Herrn Professor Dr. H. O e l s c h l ä g e r , danke ich, daß er mir Gelegenheit zur Fertigstellung meiner Arbeit gegeben und mich in vielfacher Hinsicht unterstützt und gefördert hat.

